



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**CARACTERIZAÇÃO ELEMENTAR DAS ALTERAÇÕES EM
TECIDOS CARCINOMATOSOS DA CAVIDADE ORAL POR
TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIO-X POR DISPERSÃO
EM COMPRIMENTO DE ONDA**

Trabalho submetido por
António Luciano Granate Marques
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Setembro de 2013



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

CARACTERIZAÇÃO ELEMENTAR DAS ALTERAÇÕES EM TECIDOS CARCINOMATOSOS DA CAVIDADE ORAL POR TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIO-X POR DISPERSÃO EM COMPRIMENTO DE ONDA

Trabalho submetido por
António Luciano Granate Marques
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Professor Doutor José Silva Marques

Co-orientado por
Professor Doutor José Brito

Setembro de 2013

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais como forma da minha gratidão...

AGRADECIMENTOS

A realização desta monografia marca o fim de uma importante etapa da minha vida. Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma decisiva para a sua concretização:

Ao meu orientador, o Professor Doutor José Siva Marques, um especial agradecimento pelo apoio à realização deste trabalho e pela constante motivação para a investigação científica.

Agradeço, também, ao meu co-orientador, o Professor Doutor José Brito pela disponibilidade e colaboração neste e nos próximos projetos.

Aos serviços de Cirurgia de cabeça e Pescoço e de Anatomia Patológica do Instituto Português de Oncologia um obrigado, pelo interesse e colaboração no desenvolver deste estudo.

A todos os Professores que me acompanharam ao longo do meu percurso académico.

Aos meus colegas e amigos.

RESUMO

O principal objetivo desta revisão bibliográfica é reunir numa monografia os conhecimentos necessários à realização de um futuro trabalho de investigação, que relacione as concentrações dos elementos vestigiais em tecidos neoplásicos da cavidade oral com os que se verificam em tecidos saudáveis. Para a análise desses elementos pode ser utilizado um método de química analítica designado por fluorescência de raio-X por dispersão em comprimento de onda (WDXRF).

Esta monografia apresenta, portanto, dois temas que se interligam, o do cancro oral e o da investigação de elementos vestigiais com técnicas analíticas. No primeiro são abordados os diversos parâmetros da doença: epidemiologia, fatores de risco, diagnóstico, prognóstico e terapêutica. Aborda-se com especial relevância os capítulos do diagnóstico, referindo os mais recentes métodos disponíveis para o médico dentista, e o do prognóstico, com uma compilação dos seus mais importantes fatores, salientando o dos biomarcadores. Na parte da investigação dos elementos vestigiais com técnicas analíticas abordaram-se três capítulos: 1 - elementos vestigiais e o seu papel no cancro, 2 - investigação dos elementos vestigiais em amostras biomédicas e por fim, 3 - técnicas analíticas usadas na investigação dos elementos vestigiais, com descrição dos principais métodos capazes de detetar elementos vestigiais. A técnica de XRF foi mais desenvolvida para melhor informar sobre os seus fundamentos operacionais, uma vez que será, possivelmente, esta a técnica utilizada no trabalho de investigação futuro. Desenvolveu-se também um capítulo sobre a aplicação das técnicas analíticas no caso dos cancros da mama, cólon e estômago, como referência importante ao futuro projeto de investigação no cancro da cavidade oral. O último capítulo consiste num protocolo experimental a ser aplicado no projeto de investigação, onde se abordam aspetos fundamentais tais como: a colheita das amostras, preparação e a análise por WDXRF na máquina do ISCSEM.

Palavras-chave: *elementos vestigiais, cancro oral, biomarcadores, técnicas analíticas, WDXRF.*

ABSTRACT

The main purpose of this work is to survey the necessary body of knowledge for a future research project. The scope of this research work is to correlate the concentrations of trace elements in neoplastic tissues on the oral cavity with those occurring in healthy tissues. For the analysis of these elements a novel approach was envisaged by using a method of analytical chemistry called WDXRF due to the availability of research equipment and know-how in the University.

The monograph presents two interrelated subjects, the oral cancer and the research of trace elements with analytical techniques. The first subject creates a context for understanding the various parameters of the disease: epidemiology, risk factors, diagnosis, prognosis and treatment. Some chapters were considered more relevant and are more thoroughly discussed: diagnosis, reviewing the latest methods available to the dental practitioner; and prognosis, with a compilation of the most important factors and highlighting the role of biomarkers.

The research of trace elements with analytical techniques was decomposed in three sections: trace elements and their role in cancer; research of trace elements in biomedical specimens and, finally, analytical techniques used to investigate trace elements, describing the main methods available to detect trace elements. The XRF technique was further developed to better enlighten its operating fundamentals, due to the possibility of its usage in future research work. A chapter on the application of analytical techniques in other cancers like breast, colon and stomach was introduced as pointers for future research on cancer of the oral cavity project. The last chapter consists of an experimental protocol to be applied in the research project, which addresses fundamental aspects such as: collection of samples, preparation and analysis in the ISCSEM's WDXRF machine.

Key words: *Trace elements, oral cancer, biomarkers, analytical techniques, WDXRF*

ÍNDICE GERAL

1	INTRODUÇÃO	12
2	DESENVOLVIMENTO.....	15
2.1	CANCRO ORAL	15
2.1.1	Epidemiologia	15
2.1.2	Fatores de risco:	17
2.1.3	Diagnóstico:.....	24
2.1.4	Prognóstico.....	38
2.1.5	Terapêutica:.....	49
2.2	ELEMENTOS VESTIGIAIS:	52
2.2.1	Elementos vestigiais e o seu papel no cancro	54
2.2.2	Investigação de elementos vestigiais em amostras biomédicas	58
2.2.3	Técnicas analíticas na investigação de elementos vestigiais	60
2.3	FUNDAMENTOS DA XRF	67
2.4	APLICAÇÕES DAS TÉCNICAS ANALÍTICAS NO CANCRO:.....	75
2.4.1	Cancro da mama	76
2.4.2	Cancro do cólon.....	77
2.4.3	Cancro do estômago	78
2.4.4	Cancro da cavidade oral.....	78
2.5	PROJETO DE INVESTIGAÇÃO.....	79
3	Conclusão	84
4	Bibliografia.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Países com elevada incidência e mortalidade de cancro oral	15
Figura 2 - Leucoplasia num 2º quadrante edêntulo	18
Figura 3 - Eritroplasia no pavimento da boca.....	19
Figura 4 - Tipos de atrasos no diagnóstico do cancro oral	24
Figura 5 - Úlcera não cicatrizante na face lateral da língua	25
Figura 6 - Exame extraoral dos nódulos linfáticos	27
Figura 7 - Exame da mucosa labial.....	27
Figura 8 - Protrusão da língua com o auxílio de uma compressa.....	28
Figura 9 - Palpação bimanual do pavimento da boca.....	29
Figura 10 - Exame intraoral da orofaringe e trígono retromolar	29
Figura 11 - Coloração de uma lesão suspeita com TB no bordo lateral da língua	31
Figura 12 - Coloração com MB de uma lesão no pavimento da boca.....	32
Figura 13 - Florescência dos tecidos	33
Figura 14 - Lesão de displasia epitelial com perda de fluorescência	34
Figura 15 - concentrações salivares de alguns biomarcadores	35
Figura 16 - Utilização da escova do sistema de biópsia de escovagem OralCDx®.....	36
Figura 17 - Utilização da <i>Punch biopsy</i>	37
Figura 18 - Risco de metástases nodulares em relação à espessura do tumor primário .	39
Figura 19 - Níveis dos nódulos linfáticos.....	42
Figura 20 - Esquema das duas técnicas mais comuns de XRF (EDXRF e WDXRF)....	65
Figura 21 - Transições possíveis dos eletrões	68
Figura 22 - Esquema do funcionamento básico de um WDXRF	69
Figura 23 - Esquema do funcionamento básico de um EDXRF.....	69
Figura 24 - Tubo de raio-X; A - ânodo, C - cátodo, W – janela.....	70
Figura 25- Relação entre amostra, cristal de análise e detetor no círculo de Rowland..	71

Figura 26 - Típico espectro EDXRF do cancro da mama	74
Figura 27 - Gráfico das concentrações dos elementos vestigiais Fe e Zn em tecidos da mama saudável e neoplásico.....	77
Figura 28 - Amostra de carcinoma da língua	80
Figura 29 – liofilizador	81
Figura 30 – Moagem	81
Figura 31 - Compressão do pó em pastilha	82
Figura 32 - Análise da amostra na máquina de WDXRF	82
Figura 33 - Esquema de funcionamento da máquina	82

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos elementos vestigiais pela OMS	53
Tabela 2 - Comparação de técnicas analíticas	75

LISTA DE ABREVIATURAS

IPO: Instituto Português de Oncologia

ISCSEM: Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz

HPV: Vírus papiloma humano

PMD: Distúrbio potencialmente maligno

IARC: Agência Internacional para Pesquisa do Cancro

TB: Azul toluidina

MB: Azul-de-metileno

FP: Fator de prognóstico

AAS: Espectrometria de Absorção Atômica

FAAS: Espectrometria de absorção atômica por chama

GFAAS: Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite

ICP-AES: Espectrometria de emissão atômica – com plasma acoplado

ICP-MS: Espectrometria de massa – com plasma acoplado

XRF: Fluorescência de raios-X

EDXRF: Fluorescência de raios-X com dispersão de energia

WDXRF: Fluorescência de raios-X com dispersão em comprimento de onda

1 INTRODUÇÃO

O cancro oral permanece como uma das poucas doenças orais potencialmente fatais no mundo ocidental, ocupando a sexta posição de cancro com maior incidência a nível global. A lesão maligna mais comum na cavidade oral é o carcinoma espinocelular, outros tipos de cancro incluem os carcinomas de células não-escamosas, sarcomas, linfomas e melanomas (Warnakulasuriya, 2009; Zini, Czerninski, & Sgan-Cohen, 2010).

A língua é o local mais comum para o cancro intraoral nas populações ocidentais, com uma incidência de 40-50%. Em Portugal a incidência do cancro oral e da orofaringe tem vindo a aumentar; esta tendência de aumento foi mais evidente para o cancro oral nas mulheres e para o cancro da orofaringe nos homens. A maioria dos países apresenta taxas de sobrevivência de cinco anos para o cancro da língua, da cavidade oral e da orofaringe em torno de 50%. O melhor resultado é para o cancro do lábio, mais de 90% dos pacientes sobrevivem depois de cinco anos. A menor sobrevivência é a dos tumores da hipofaringe (Monteiro, Antunes, Bento, & Warnakulasuriya, 2013; Zini et al., 2010).

A incidência do cancro oral tem aumentado globalmente na última década, grande parte devido ao diagnóstico tardio, consequência da falta de formação dos profissionais de saúde para a deteção precoce das lesões e ao facto dos pacientes demorarem cerca de 3 meses a procurar aconselhamento profissional após terem conhecimento de qualquer sintoma (Gómez et al., 2010; Messadi, 2013).

Apesar dos avanços terapêuticos, o diagnóstico precoce do cancro oral e das lesões pré-malignas continua a ser a melhor forma de garantir a sobrevivência e qualidade de vida do paciente (Messadi, 2013).

Recentemente vários avanços têm sido alcançados a nível do cancro oral, que permitiram o desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico potencialmente úteis a nível clínico e molecular para a deteção precoce do cancro oral. O *Golden standard* para o diagnóstico do cancro oral continua a ser a biópsia do tecido com a avaliação histológica, mas esta técnica necessita sempre de um profissional de saúde treinado e de um histopatologista experiente, sendo também considerada um método invasivo, doloroso, dispendioso e demorado (Avon & Klieb, 2012; Messadi, 2013).

Os biomarcadores, essenciais para o diagnóstico e prognóstico, são qualquer tipo de elemento mensurável, capaz de demonstrar a presença de malignidade ou potencial maligno, ou de prever o comportamento do tumor em relação ao tratamento. A identificação de novos marcadores é crucial, pois estes permitem personalizar o tratamento, adequando-o para a cada tipo de tumor, evitando desse modo tratamentos desnecessários que podem deteriorar a qualidade de vida do paciente (Schliephake, 2003; Marina Silva, Soave, Ribeiro-Silva, & Poletti, 2012).

A análise dos elementos vestigiais, constituintes essenciais de proteínas, enzimas e membranas celulares, ganhou grande interesse, devido ao seu papel em certas funções vitais do organismo. Quando há uma expressão anormal, parecem contribuir para vários processos patológicos, incluindo o crescimento tumoral, invasão e metástase. Alguns elementos, tais como, ferro, cobre e zinco são encontrados em concentrações significativamente mais elevadas nos tecidos neoplásicos (malignos e benignos) do que nos tecidos saudáveis, pelo que aparentam ter um elevado potencial como biomarcadores de diagnóstico e de prognóstico, apesar do seu papel ainda não estar completamente descrito na literatura disponível (Mulware, 2012; Marina Silva et al., 2012).

Para a análise dos elementos vestigiais recorre-se a diversas técnicas de química analítica que permitem obter dados qualitativos e quantitativos sobre os elementos presentes na amostra. A técnica de fluorescência de raios-X (XRF) é uma técnica de análise multielementar com diversas vantagens relativamente a outros métodos de investigação, porque se trata de um procedimento simples e rápido de análise de um grande número de amostras, alta sensibilidade e limites de deteção relativamente baixos, ou seja permite a determinação de elementos em baixas concentrações (Mariana Silva, Tomal, Pérez, Ribeiro-Silva, & Poletti, 2009; Marina Silva et al., 2012).

Existe uma série de estudos sobre os níveis dos elementos vestigiais em tecidos neoplásicos e saudáveis humanos, principalmente no fígado, pulmão e rim, utilizando diferentes técnicas analíticas (Mulware, 2013). No entanto existem poucos estudos que apliquem a análise de elementos vestigiais em tecidos carcinomatosos e não-carcinomatosos da cavidade oral. A grande maioria dos estudos utiliza amostras de soro sanguíneo e alguns utilizam amostras de saliva (Ayinampudi & Narsimhan, 2012; Khanna, Udas, Kumar, Suvana, & Karjodkar, 2013; Shetty et al., 2013).

O presente trabalho consiste numa revisão bibliográfica e está dividido em duas grandes vertentes, a do cancro oral e das técnicas de química analítica. Na primeira parte do trabalho são abordados os diversos aspetos da patologia, dando especial relevância ao diagnóstico, prognóstico e ao papel dos diversos elementos vestigiais no cancro em geral. No diagnóstico descrevem-se os mais recentes métodos, passíveis de serem utilizados pelo médico dentista na deteção e diagnóstico de lesões potencialmente malignas e de cancro oral, bem como a importância do exame convencional da cavidade oral por parte do profissional e a do auto-exame por parte dos pacientes. No prognóstico faz-se uma síntese dos fatores principais capazes de determinar o desfecho da doença, com uma compilação dos principais fatores de prognóstico moleculares para o cancro da cabeça e pescoço. Nesta vertente é também abordado o tema dos elementos vestigiais, descrevendo a sua função no organismo e o seu papel no surgimento do cancro.

Na segunda parte desta monografia descrevem-se os fundamentos das técnicas de química analítica, com uma breve descrição dos métodos mais utilizados e aprofundando os aspetos mais importantes da espectrometria de fluorescência (XRF). Faz-se também uma síntese das principais aplicações dos métodos de química analítica em oncologia, nomeadamente para os cancros da mama, cólon, estômago e cavidade oral.

A parte final deste trabalho consiste num protocolo experimental a ser aplicado, em larga escala, no trabalho de investigação futuro, com um número de amostras elevado, passível de comprovar a existência de variações nas concentrações de certos elementos vestigiais em tecidos carcinomatosos da cavidade oral e, possivelmente utilizar esses elementos como biomarcadores de diagnóstico e de prognóstico. Neste capítulo abordam-se alguns aspetos fundamentais, tais como a colheita das amostras, preparação e a análise por WDXRF na máquina do ISCSEM.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 CANCRO ORAL

2.1.1 Epidemiologia

O cancro oral é um problema grave que tem vindo a alastrar a várias zonas do globo, sendo hoje em dia o sexto cancro mais comum no mundo. Mais de 90% das lesões malignas da cavidade oral são carcinomas das células escamosas (Warnakulasuriya, 2009).

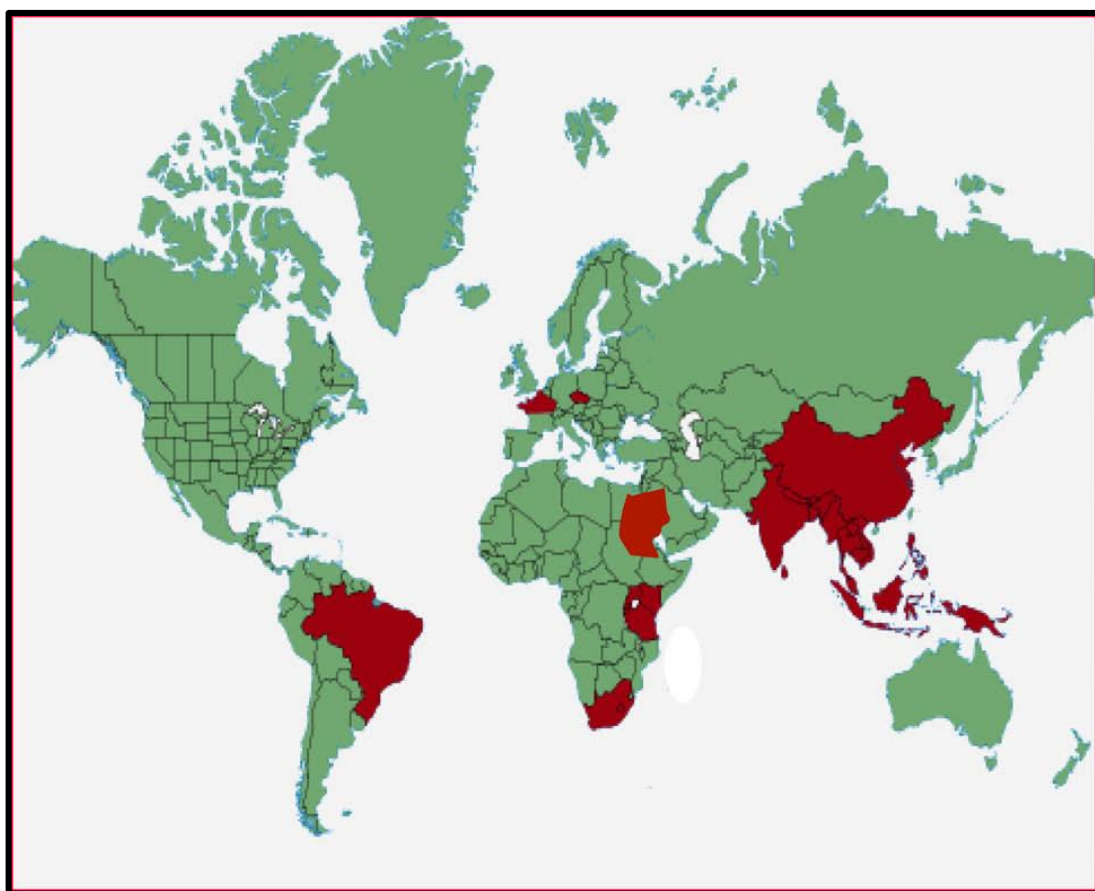


Figura 1 - Países com elevada incidência e mortalidade de cancro oral (Warnakulasuriya, 2009)

A nível europeu o cancro oral e da orofaringe ocupam a 7^a posição, estando a França e a Hungria no topo dos países com mais incidência. Espanha, Portugal, Alemanha, Suíça e as regiões do norte de Itália apresentam taxas de incidência intermédias quando comparadas com outros países europeus. O Reino Unido surge, à semelhança de outros países (Grécia, Finlândia e Suécia) como um dos países em que o cancro oral é pouco comum, estando na décima quarta posição (Ferlay et al., 2007; Warnakulasuriya, 2009).

Na América do sul e Caraíbas, o cancro oral e da orofaringe surge na 5ª posição no ranking dos cancros mais prevalentes. Países como o Brasil, Argentina e Uruguai apresentam os níveis de incidência mais elevados (Warnakulasuriya, 2009).

No continente africano é extremamente difícil recolher dados de incidência de cancro oral, uma vez que existem poucos hospitais com registos de cancro; no entanto não há grande evidência que o cancro oral seja um problema sério nos países deste continente (Warnakulasuriya, 2009).

Os países do sul da ásia encontram-se entre os países com maior incidência de cancro oral e da orofaringe, no mundo. Apesar de a Índia ter sido sempre considerada como o país com maior incidência deste tipo de cancros, estudos mais recentes revelam que o Sri Lanka é o país com maior incidência, com 15,5% de todos os cancros na população masculina. No outro lado do espectro temos o Japão, onde o cancro oral e da orofaringe é pouco comum, com uma taxa de incidência de 1.1% (Jemal et al., 2011; Warnakulasuriya, 2009).

Em Portugal mais de 9600 casos de cancro do lábio, cavidade oral e orofaringe surgiram entre os anos de 1998 e 2007. Durante esta década houve um aumento gradual do nível de incidência deste tipo de cancro (1.96%/ano em ambos os sexos), provavelmente associado ao aumento do consumo de tabaco e álcool nas últimas décadas em Portugal. Houve uma maior incidência em ambos os sexos em idades superiores a 45 anos, sendo o grupo de indivíduos do sexo masculino entre os 60 e 64 anos o mais afetado. A relação da incidência entre os dois sexos é de 3.7:1, tendo os homens uma taxa de 78,6%. O sexo feminino registou um aumento de 4,3%/ano, à semelhança de outros países europeus (Ferlay et al., 2007; Monteiro et al., 2013). Estes dados podem estar relacionados com os novos padrões tabágicos e alcoólicos entre homens e mulheres, pois apesar de se verificar uma diminuição do consumo de tabaco na europa, contudo nas mulheres este hábito tem vindo a diminuir mais lentamente do que nos homens. Em relação ao álcool, Portugal, no ano 2005, foi o quarto país com o maior consumo de vinho *per capita*; o consumo de cerveja e bebidas destiladas tem vindo a aumentar na população feminina (Monteiro et al., 2013).

Houve um aumento significativo do cancro da orofaringe, principalmente em homens, á semelhança do que tem vindo a ocorrer em vários países desenvolvidos (Holanda, Dinamarca, Estados Unidos e Escócia). Vários estudos relacionam o aumento da

incidência deste tipo de cancro com o vírus papiloma Humano (HPV), no entanto, em Portugal é necessário investigar mais para confirmar esta associação (Monteiro et al., 2013).

O cancro do lábio foi o único cancro que demonstrou uma diminuição na sua incidência, o que revela as diferentes causas etiológicas quando comparado com os cancros orais e da orofaringe (Monteiro et al., 2013).

2.1.2 Fatores de risco:

O cancro das células escamosas orais está claramente associado a certos estilos de vida, daí ser necessário tomar medidas para o evitar, é contudo de salientar que o mesmo pode ocorrer em pessoas que nunca fumaram ou fizeram um uso abusivo de álcool. Todos os membros da equipa clínica devem estar habilitados na prevenção primária, conhecendo as causas e identificando os pacientes com elevado risco de cancro oral (Speight, Warnakulasuriya, & Ogden, 2010).

Fatores de risco estabelecidos:

a) Tabaco fumado (cigarro, charuto, cachimbo) / Tabaco não fumado (tabaco de mascar e rapé)

O consumo de tabaco é o principal fator de risco para o carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço. O risco está altamente relacionado com a intensidade e duração do hábito. Em todas as formas de consumo de tabaco, incluindo o cigarro como risco dominante, entram como constituintes nitrosaminas e hidrocarbonetos policíclicos, que são considerados elementos carcinogénicos genotóxicos, que aumentam o risco de doença (Ferreira Antunes et al., 2013; Ram et al., 2011; Speight et al., 2010).

b) Consumo elevado de álcool

O álcool aumenta a exposição da mucosa a agentes carcinogénicos, elevando a absorção celular dos mesmos. O acetaldeído, um dos metabolitos do álcool, une-se ao DNA, impedindo a sua síntese e reparo. O fumo associado ao consumo de álcool aumenta o risco de carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço em 40x, havendo no entanto uma grande variação em termos da suscetibilidade individual genética, que desempenha um importante papel no desenvolver da doença (Ferreira Antunes et al., 2013; Ram et al., 2011; Speight et al., 2010).

c) Presença de distúrbios potencialmente malignos (PMD)

Uma lesão pré-cancerígena é um tecido morfológicamente alterado, onde a probabilidade de desenvolver cancro oral é maior. São exemplo, a leucoplasia e a eritroplasia. Uma condição pré cancerosa é um estado generalizado associado a um aumento significativo do risco para cancro; por exemplo, fibrose submucosa e líquen plano. No entanto em 2005 a OMS decidiu utilizar o termo “*potentially malignant disorders* (PMD)” (distúrbios potencialmente malignos), pois transmite a ideia de que nem todos os distúrbios sofrem malignização e se transformam em cancro (Nair, Pruthy, Pawar, & Chaturvedi, 2012).

i. Leucoplasia

Placa ou mancha queratótica branca, não destacável, sem outro diagnóstico atribuído clínica ou histologicamente. Pode ser idiopática, mas é frequentemente associada a carcinogêneos, como o tabaco ou a noz de areca. Existem vários subtipos clínicos de leucoplasia, baseados nas características superficiais da lesão (Messadi, 2013; Nair et al., 2012; Speight et al., 2010):

- Homogênea – surge em qualquer área da boca, como uma mancha uniforme, branca e elevada. A superfície pode ser lisa ou fissurada.
- Verrucosa – lesão branca com uma superfície hiperplásica e rugosa
- Nodular – lesão com uma superfície granular, frequentemente associada a infecções por *Candida Albicans* (Speight et al., 2010)

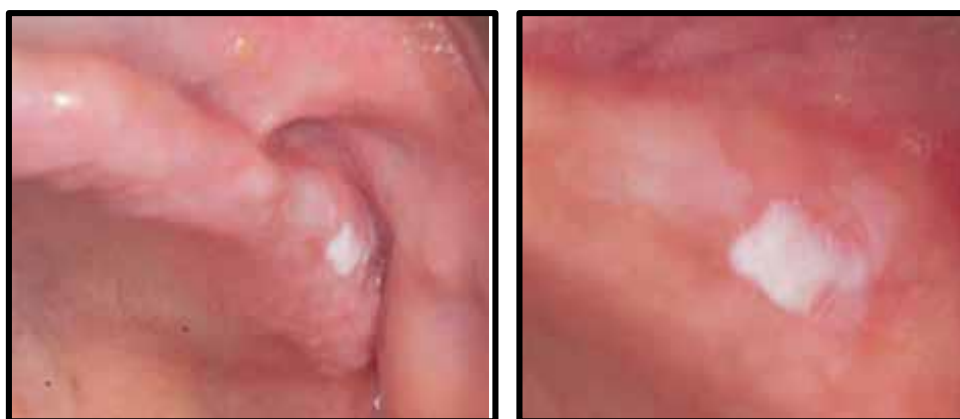


Figura 2 - Leucoplasia num 2º quadrante edêntulo (Kerr & Shah, 2013)

ii. Eritroplasia

Qualquer lesão na mucosa oral que se apresente como placas vermelhas brilhantes, aveludadas ou granulares, normalmente com contornos difusos que não podem ser caracterizadas clinicamente ou patologicamente como nenhuma outra condição reconhecida. Eritroplasia apresenta um maior potencial maligno do que a leucoplasia (Messadi, 2013; Nair et al., 2012; Speight et al., 2010).



Figura 3 - Eritroplasia no pavimento da boca (Kerr & Shah, 2013)

iii. Eritroleucoplasia

Pode conter elementos de qualquer dos tipos acima mencionados, com uma mistura de placas brancas e vermelhas (Speight et al., 2010).

iv. Líquen plano

Surge como placas brancas simétricas, estrias queratóticas com um padrão reticular característico (estrias de wickham). Em associação com atrofia, erosão, descamação da gengiva ou ulceração superficial da mucosa oral (Messadi, 2013; Nair et al., 2012; Speight et al., 2010).

v. Fibrose submucosa

Condição que afeta acima de tudo a população asiática que masca noz de areca. Caracterizada pela perda de elasticidade, palidez e surgimento de bandas fibróticas na mucosa oral, que limitam a abertura da boca. A língua encontra-se despapilada e sem

mobilidade. Apresenta um elevado risco de malignização (Messadi, 2013; Nair et al., 2012; Speight et al., 2010).

vi. Lupus eritematoso

As lesões orais aparecem como uma área de atrofia ou erosão, rodeada por um halo queratótico branco; a mucosa oral e os lábios são os locais onde mais frequentemente se manifesta esta condição (Messadi, 2013; Nair et al., 2012; Speight et al., 2010).

vii. Sífilis terciária

Hoje em dia é uma situação rara em países desenvolvidos, uma vez que a sífilis é geralmente diagnosticada e tratada precocemente. A placa queratótica de sífilis terciária surge no dorso da língua e, ocasionalmente, pode ser associada ao desenvolvimento de cancro oral na linha média da língua (Ram et al., 2011; Speight et al., 2010).

viii. Queratose actínica

Caracterizada pela erosão e formação de crostas brancas ou acastanhadas no vermelhão do lábio inferior. É causada pela exposição à luz ultravioleta, em particular a partir de luz solar intensa. Afeta principalmente pessoas com ocupações profissionais no exterior (Nair et al., 2012; Speight et al., 2010).

ix. Distúrbios hereditários

Existem alguns síndromes hereditários que podem aumentar a suscetibilidade para o cancro, são eles a disqueratose congénita (DC) e a epidermólise bulhosa, duas condições genéticas raras. Os pacientes com DC podem desenvolver placas brancas no dorso da língua que podem ser confundidas com leucoplasia, no entanto estas surgem na ausência de hábitos de risco e em idades jovens. A epidermólise bolhosa leva à formação de vesículas na pele e nas membranas mucosas, em resposta ao calor, atrito, fricção, ou pequenos ferimentos, deixando estes tecidos extremamente frágeis e suscetíveis ao desenvolvimento de cancro (Messadi, 2013; Nair et al., 2012).

d) Exposição excessiva à luz solar ou radiação

A luz ultravioleta pode levar a mutações no DNA, aumentando assim o risco para desenvolver cancro da pele e do lábio. O médico dentista deve alertar o paciente para evitar a exposição excessiva ao sol e recomendar o uso de protetor solar labial. O lábio inferior é o mais suscetível por se encontrar mais exposto à luz solar. A população com ocupações profissionais no exterior tem maior probabilidade de desenvolver cancro labial, pois os efeitos da exposição solar são cumulativos (Cogliano et al., 2011; Speight et al., 2010).

e) Idade (em conjunto com os outros riscos listados)

Considera-se a idade como um fator de risco estabelecido, porque a exposição aos riscos previamente mencionados (álcool, tabaco, exposição solar, etc...) pode aumentar com a idade; no entanto a idade por si só não é considerada um fator de risco. Estudos recentes referem, aliás, que a incidência do cancro oral tem vindo a aumentar nas faixas etárias jovens (Speight et al., 2010).

f) Mascar noz de areca

A noz de Areca é a semente do fruto de uma palmeira oriental (*Areca catechu*) e consiste no ingrediente principal de uma grande variedade de produtos mascarados. A noz é, normalmente, cortada em fatias finas, e misturada com uma variedade de substâncias, tais como a folha de betel (do *Piper betel*, um arbusto de pimenta), tabaco, cal apagada (hidróxido de cálcio) e catechu (extrato da árvore *Areca catechu*). A noz de Areca é mascarada principalmente por Indo-asiáticos e Chineses, sendo usada por homens e mulheres em todas as faixas etárias e classes sociais, com uma profunda relação com atividades socioculturais e religiosas (Messadi, 2013; Warnakulasuriya, Trivedy, & Peters, 2002).

O consumo da noz de areca leva ao surgimento de Nitrosaminas na saliva, um agente carcinogénico que induz alterações pré-neoplásicas orais com uma alta propensão para progredirem para cancro. Foi comprovado que o uso de noz de areca individualmente aumenta o risco de desenvolvimento de neoplasia oral, no entanto a adição de tabaco na mistura aumenta ainda mais essa probabilidade. Daí, a Agência Internacional para

Pesquisa do cancro (IARC) chegar à conclusão de que existem provas suficientes de que o hábito de mascar “betel quid” (produto derivado da noz de areca), com ou sem tabaco, é carcinogénico para os seres humanos (Secretan et al., 2009).

No Reino Unido e, possivelmente em outros países desenvolvidos, o consumo da noz de areca é maior, e é frequentemente reforçado com a imigração. Asiáticos britânicos trouxeram o uso da noz de areca da Índia, Paquistão, Bangladesh e outros países da região. Tal situação pode estar também a ocorrer em Portugal, pelo que o médico dentista deve estar atento a pacientes com este hábito de risco (Warnakulasuriya et al., 2002).

g) História pregressa de cancro

O risco de desenvolver cancro da cavidade oral está mais elevado em paciente com história pregressa de cancro oral ou da orofaringe. Num estudo realizado por Levi, Te, Randimbison, Maspoli, & La Vecchia (2006) concluiu-se que os pacientes com história pregressa de cancro da faringe têm uma probabilidade 30x superior para o surgimento de novas lesões de cancro na cavidade oral e orofaringe.

Outros possíveis fatores de risco:

a) Dieta

Há alguma evidência de que a má nutrição pode estar associada a um risco aumentado de cancro oral. As vitaminas antioxidantes, A, C e E e carotenóides (betacaroteno) eliminam os radicais livres potencialmente mutagénicos de células danificadas, ajudando, portanto, a inibir o desenvolvimento de cancro. Frutas e legumes amarelos, verdes e vermelhos são fontes naturais destes micronutrientes; portanto, dietas ricas com base nestes alimentos podem reduzir o risco de cancro oral (Ram et al., 2011; Speight et al., 2010).

b) Infecções virais

O vírus do papiloma humano (HPV) e do herpes simplex (HSV) têm vindo a ser considerados, nos últimos anos, como agentes causadores de cancro oral. O HPV,

conhecido por causar cancro do colo do útero, tem sido identificado em 23.5% dos casos de cancro oral, particularmente em cancros da orofaringe. A estirpe mais frequente é a do HPV-16 (90-95%), seguida do HPV-18. O modo de transmissão do HPV a nível do cancro da cabeça e pescoço não está inteiramente determinado, suspeitando-se de que o comportamento sexual esteja associado. O HSV-1 (herpes oral) manifesta-se geralmente através de feridas em torno da boca e dos lábios e tem sido sugerido como agente causal do cancro oral. Num estudo foi determinado que o HSV-1 promove o desenvolvimento de cancro das células escamosas orais em pacientes infectados pelo HPV e nos indivíduos com precedentes de hábitos tabágicos (Cogliano et al., 2011; Galbiatti et al., 2013; Messadi, 2013; Ram et al., 2011).

c) Imunodeficiência e imunossupressão

A Imunossupressão predispõe certos indivíduos a um aumento do risco para o cancro oral. Têm sido relatados carcinomas do lábio nalguns pacientes submetidos a transplante renal que receberam medicamentos imunossupressores, bem como carcinomas orais em pacientes jovens com SIDA (Neville & Day, 2002). No entanto devido ao reduzido tamanho das amostras e a tendência para a presença de outros fatores de risco, como consumo excessivo de álcool e tabagismo, parece improvável que o surgimento da infeção pelo HIV e o uso de medicação imunossupressora contribua para o aumento do cancro oral nos jovens (Llewellyn, Johnson, & Warnakulasuriya, 2001).

d) Infeção crónica na cavidade oral

A Periodontite está associada a marcadores inflamatórios elevados e, assim, a um maior risco de efeitos adversos à saúde. Esta infeção crónica e a sua resposta inflamatória sistémica pode ser uma via de promoção carcinogénica. Estudos revelam que as mudanças ecológicas orais que acompanham a doença periodontal são caracterizadas pela proliferação de microrganismos redutores de nitratos, contribuindo para o aumento das concentrações de carcinogénicos (Divaris et al., 2010).

Evidências recentes indicam que os microrganismos cariogénicos comuns, tais como os *Streptococcus* podem contribuir substancialmente para o aumento da concentração de acetaldeído na cavidade oral. Hooper, Wilson, & Crean, (2009) determinaram que há

evidência suficiente para sugerir a existência de vínculos epidemiológicos e etiológicos entre a infecção microbiana na cavidade oral e cancro oral.

2.1.3 Diagnóstico:

Importância do diagnóstico precoce

A prevenção do cancro oral e da sua morbilidade e mortalidade associadas, depende do diagnóstico precoce das lesões orais potencialmente malignas, permitindo a avaliação histológica e posterior tratamento, depende, em resumo, da fase de diagnóstico (Messadi, 2013).

O estadiamento clínico de uma lesão maligna da cavidade oral é um dos grandes fatores de prognóstico, havendo uma relação direta entre as lesões malignas diagnosticadas em estádios mais avançados e as taxas de recorrência e de mortalidade (Galbiatti et al., 2013; Messadi, 2013; Nair et al., 2012).

O momento do diagnóstico é influenciado por uma série de variabilidades clínicas e sociodemográficas, podendo a culpa do atraso ser atribuída quer ao paciente, quer ao profissional clínico (Messadi, 2013). Um estudo realizado por Peacock, Pogrel, & Schmidt, (2008) revelou que o maior atraso no diagnóstico é o tempo entre o primeiro sintoma e a primeira visita a um centro de saúde, com uma média de ~105 dias; é portanto, necessário melhorar os programas de sensibilização ao público de forma a incentivar a ida ao profissional de saúde.

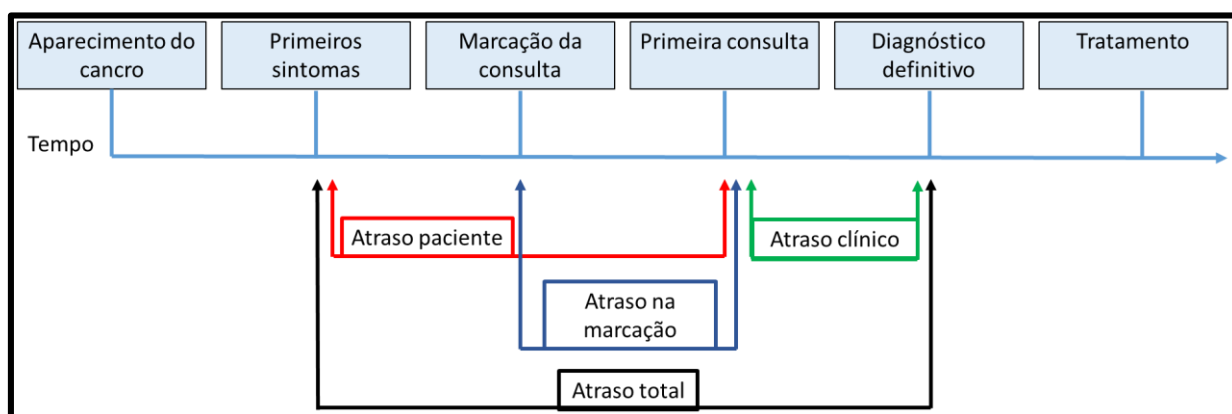


Figura 4 - Tipos de atrasos no diagnóstico do cancro oral (adaptado de Gómez et al., 2010)

Outra variável que influencia o diagnóstico tardio prende-se com a acessibilidade aos serviços de saúde; esta encontra-se limitada por motivos de ordem financeira, estrutural e pessoal. As populações carenciadas são as que mais sofrem com o aspeto da acessibilidade aos serviços de saúde e são elas: famílias que vivem da segurança social, imigrantes, sem abrigo, pessoas idosas e as minorias sociais (Gómez et al., 2010; Messadi, 2013).

Apesar de um exame da cavidade oral visual e tátil demorar cerca de 90 segundos, reduzidos médicos e dentistas estão a realizar estes exames. Estudos revelam que os dentistas e outros prestadores de cuidados de saúde necessitam de uma atualização académica na prevenção e deteção precoce do cancro oral, pois existem diversas lesões a serem negligenciadas nos exames de rotina, levando a um diagnóstico tardio (Horowitz, 2001; Messadi, 2013).

Sinais de alarme a que o médico dentista deve estar atento:

- Úlcera na mucosa oral que não cicatriza dentro de duas semanas, mesmo com o tratamento adequado, e para a qual nenhum outro diagnóstico (por exemplo, úlcera aftosa) pode ser estabelecido.
- Manchas vermelhas ou brancas na mucosa
- Crescimento dos tecidos produzindo uma superfície elevada, com textura de couve-flor.
- Fixação da mucosa aos tecidos subjacentes, com perda da mobilidade normal, dificultando a extrusão da língua (anquiloglossia)
- Dificuldade na cicatrização de um alvéolo, ou qualquer outra ferida.
- Mobilidade e/ou perda de peças dentárias sem causa aparente
- Dor persistente na cavidade oral e sensação de parestesia na língua
- Dificuldade em mastigar, disfagia e consequente perda de peso, sem motivo aparente



Figura 5 - Úlcera não cicatrizante na face lateral da língua (Speight et al., 2010)

(Bagan, Sarrion, & Jimenez, 2010; Speight et al., 2010)

Métodos de rastreio:

a) Examinação para cancro oral

i. Método convencional

Trata-se do método de rastreio mais frequentemente aplicado e aceite para o carcinoma epidermóide oral. É um método simples e barato, considerado igualmente eficaz na deteção de lesões potencialmente malignas, a praticar por dentistas juniores e seniores, bem como profissionais de saúde ou auxiliares devidamente treinados (Messadi, 2013; Nair et al., 2012).

Sankaranarayanan et al.(2005) comprovaram a eficácia de um programa de rastreio, por método convencional, num estudo a longo prazo, entre 1996 e 2004. Apesar de não ter havido um aumento da sobrevida na população em geral, houve um aumento significativo na população masculina com elevado risco. Esta foi a primeira evidência do benefício do rastreio do cancro oral em termos de redução das taxas de mortalidade.

Um exame completo da cavidade oral realiza-se em cerca de 90 segundos e deve sempre ser complementado com uma boa história clínica médica e odontológica do paciente, inspeções extraorais e intraorais da cabeça e pescoço e palpação de locais específicos relacionados (Horowitz, 2001; Messadi, 2013).

Exame recomendado pela Organização Mundial de Saúde:(Horowitz, 2001; Kerr & Shah, 2013)

Passo 1: Examinação extraoral

- Inspeção da face, cabeça e pescoço com especial atenção com especial atenção aos pacientes que parecem passar muito tempo no sol
- Registar qualquer assimetria ou lesões na pele, tais como crostas, fissuras e aumentos de volume
- Palpação bilateral dos nódulos linfáticos regionais nas áreas submandibular e pescoço
- Caso se note aumento de volume na zona dos nódulos linfáticos, deve-se avaliar a sua mobilidade e consistência



Figura 6 - Exame extraoral dos nódulos linfáticos (Kerr & Shah, 2013)

Passos 2 – 8: exame dos tecidos periorais e intraorais. É necessário iluminação adequada, espelho intraoral e compressas esterilizadas

2. Lábios:

- Examinar os lábios tanto de boca aberta como fechada
- Observar a cor dos lábios, a textura e quaisquer anormalidades nos contornos do vermelhão

3. Mucosa labial:

- Com a boca do paciente parcialmente aberta, examinar visualmente a mucosa dos lábios, sulco do vestíbulo maxilar e mandibular, bem como o freio
- Observar a cor, a textura, a presença de edemas e qualquer outro tipo de anormalidade



Figura 7 - Exame da mucosa labial

4. Mucosa oral:

- Tracionar e examinar a mucosa oral, que se estende desde a comissura labial até aos pilares anteriores amigdalinos

- Registrar qualquer alteração em termos de pigmentações, cor, textura e outras anormalidades da mucosa
- Ter particular atenção às comissuras labiais

5. Gengiva:

- Examinar os sulcos gengivais e alveolares por vestibular e lingual/palatino
- Começar em posterior do lado direito maxilar e percorrer a arcada até chegar ao lado esquerdo posterior, continuar pelo lado esquerdo mandibular em posterior e percorrer a arcada inferior até ao lado direito.

6. Língua:

- A boca deve estar parcialmente aberta e a língua numa posição de repouso
- Inspeccionar o dorso, observando qualquer edema, ulceração ou alterações de tamanho, cor e textura
- Pedir ao paciente para protruir a língua e verificar se há alguma alteração em termos de mobilidade ou posicionamento
- Com a compressa segurar a ponta da língua de forma a ajudar na protusão total da língua



Figura 8 - Protrusão da língua com o auxílio de uma compressa (Horowitz, 2001)

- Com o espelho intraoral inspeccionar as zonas posteriores e os bordos laterais da língua
- Passar suavemente o dedo indicador ao longo dos bordos laterais da língua e registar a presença de quaisquer tecidos duros.

- Examinar a superfície ventral, pedindo ao paciente que eleve a língua ao palato, palpar a língua, esta deve mostrar-se macia e flexível

7. Pavimento da boca

- Ainda com a língua numa posição elevada, inspecionar o pavimento da boca, observando alterações na cor, textura, edemas e anormalidades.
- Para ajudar na inspeção, secar o pavimento com compressas, estas podem também auxiliar no controlo da língua.



Figura 9 - Palpação bimanual do pavimento da boca (Kerr & Shah, 2013)

8. Palato

- Colocar a cabeça do paciente ligeiramente inclinada para trás e com a boca aberta pressionar suavemente com o espelho intraoral a base da língua
- Inspeccionar os palatos duro e mole



Figura 10 - Exame intraoral da orofaringe e trígono retromolar (Kerr & Shah, 2013)

ii. Auto exame da cavidade oral

O autoexame não é um conceito novo, sendo extremamente útil e eficaz na prevenção do cancro da mama. No entanto, existem poucos estudos relacionados com o autoexame

da cavidade oral (Chaudhari, Hegde-shetiya, Shirahatti, & Agrawal, 2013; Nair et al., 2012).

Num estudo realizado por Chaudhari et al., (2013) sobre diferentes métodos de rastreio de cancro oral, os participantes (reclusos na prisão da cidade indiana de Maharashtra) foram instruídos a respeito das lesões produzidas pelo tabaco na cavidade oral.

Posteriormente, foi-lhes pedido que identificassem lesões semelhantes na sua cavidade oral, utilizando um espelho convencional e luz natural.

Ao autoexame da cavidade oral aderiram 2.572 reclusos, dos quais 7,8% (201) relataram ter lesões pré-cancerígenas suspeitas, em 154 (76,6%) dos 201 participantes, foram diagnosticadas lesões pré-cancerígenas através de um exame clínico, enquanto que 47 (23,3%) não apresentavam alterações na mucosa.

Em comparação com outros autoexames, como o da pele ou da mama, o autoexame da cavidade oral aparenta ser um método pouco preciso na deteção dos PMD, apresentando baixa sensibilidade e especificidade. Esta falta de precisão pode dever-se à falta de conhecimento dos pacientes, quer sobre o aspeto clínico dos PMD, quer sobre o normal aspeto da cavidade oral, por vezes confundindo estruturas anatómicas com alterações da mucosa oral. (Nair et al., 2012)

O autoexame pode ser benéfico para a deteção precoce de lesões pré-cancerígenas, no entanto é necessário implementar estratégias de educação para a saúde, nomeadamente de autoexame na cavidade oral, de forma a diminuir a incidência, morbilidade e mortalidade associadas ao cancro oral, o cancro oral surge predominante nos grupos socioeconômicos mais baixos, daí que o método de educação para a saúde deva ser cuidadosamente determinado (ex. utilização de imagens em vez de textos em populações com níveis de iliteracia elevados) (Chaudhari et al., 2013; Nair et al., 2012).

A organização americana dos cirurgiões orais e maxilofaciais (AAOMS) recomenda realizar um autoexame da cavidade oral uma vez por mês, utilizando um espelho e uma boa fonte de iluminação. Deve-se retirar qualquer tipo de prótese removível, inspecionar e palpar os lábios e as gengivas, inclinar a cabeça para trás, de forma a observar e palpar convenientemente o palato, tracionar a mucosa jugal e examinar a superfície interior da mesma, bem como as gengivas mais posteriores das arcadas. Puxar, com a ajuda de uma compressa, a língua para fora da cavidade oral e observar todas as suas superfícies, palpar o pescoço em ambos os lados e por debaixo da mandíbula, procurando sentir se

há algum aumento de volume. O paciente deverá estar especialmente atento para manchas brancas e vermelhas, lesões que não cicatrizam e que sangram facilmente, aumentos de volume e de espessura dos tecidos, dores de garganta e rouquidão crônicas, dificuldade em mastigar e deglutir. Na eventualidade de um paciente descobrir algum destes sinais, deve manter a calma e marcar, o mais rapidamente possível, uma consulta com um especialista, uma vez que o diagnóstico precoce é a chave para um tratamento de sucesso.

b) Métodos auxiliares de rastreio de cancro oral:

i. Coloração dos tecidos vitais

○ Azul de toluidina (TB)

O azul de toluidina tem sido usado por mais de 40 anos como meio auxiliar na detecção de anormalidades no colo do útero e na cavidade oral. TB é um corante vital metacromático que se liga preferencialmente a tecidos com elevada divisão celular, esta coloração acidofílica dos núcleos ajuda a diferenciar áreas de *carcinoma in situ* e de carcinoma invasivo de tecidos saudáveis. Apesar desta coloração ter uma sensibilidade elevada e uma especificidade moderada para as lesões malignas (sensibilidade: 93.5% e especificidade: 73.3%), apresenta uma sensibilidade muito mais baixa para lesões pré-malignas, com taxas de falsos negativos de 58% em casos de displasia leve a moderada. A grande vantagem do azul de toluidina é ajudar a delimitar as margens em redor do cancro oral, permitindo uma cirurgia de excisão mais segura (Mehrotra & Gupta, 2011; Patton, Epstein, & Kerr, 2008).



Figura 11 - Coloração de uma lesão suspeita com TB no bordo lateral da língua (Kerr & Shah, 2013)

○ Azul-de-metileno (MB)

O Azul-de-metileno tem vindo a ser usado nos exames por endoscopia, para deteção de anormalidades gastrointestinais, como o esófago de Barrett, cancro gástrico, cancro da próstata e da bexiga (Riaz, Shreedhar, Kamboj, & Natarajan, 2013).

O mecanismo de coloração do MB é muito semelhante ao do azul de toluidina, ligando-se o MB com uma elevada afinidade ao DNA de dupla hélice das células com anormalidades metabólicas. O sistema do azul de metileno usa duas soluções, uma que é usada para corar as células com lesões e que contem: 1% de MB, 1% de malaquita, 0.5% de eosina, glicerol e dimetilsulfóxido e outra com 1% de ácido láctico e água destilada, que é utilizada antes do MB para remover os resíduos de comida e excesso de saliva, de forma a obter-se um ambiente consistente na cavidade oral. Após a aplicação do MB na zona da lesão e de um bochecho com a mesma solução durante 30 segundos, o paciente volta a bochechar com a solução de ácido láctico para remover o excesso de corante. As lesões marcadas com um azul intenso são consideradas como positivas, e as de coloração azul fraca são consideradas como negativas (Riaz et al., 2013).

No estudo realizado por Riaz et al., (2013) em que analisam a capacidade do MB como método de diagnóstico precoce de lesões pré-malignas e malignas orais, o azul metileno obteve valores de sensibilidade de 91.4% (91,3% para pré-malignas e 91,6% para cancro das células escamosas orais). Em termos de especificidade obtiveram valores de 66.6% (75% em pré-malignas e 50% em cancro das células escamosas orais). A elevada taxa de falsos positivos prende-se essencialmente com a coloração de locais de trauma e inflamação, podendo existir outros fatores, como: superfícies irregulares, retenção mecânica do corante e contaminação por saliva ou placa bacteriana.

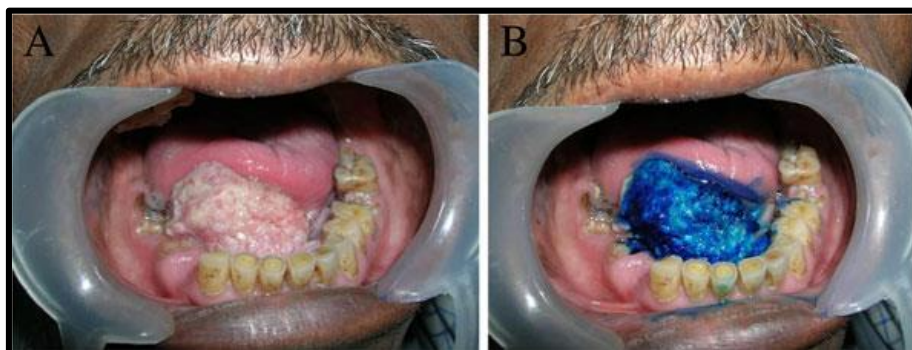


Figura 12 - Coloração com MB de uma lesão no pavimento da boca (Riaz et al., 2013)

ii. Auxiliares de visualização

Os meios auxiliares de visualização descritos de seguida baseiam-se no pressuposto de que os tecidos da mucosa com anormalidades metabólicas ou alterações estruturais têm diferentes propriedades de absorção ou reflectância quando expostos a diferentes estímulos luminosos ou energéticos (Kerr & Shah, 2013; Mehrotra & Gupta, 2011; Patton, Epstein, & Kerr, 2008).

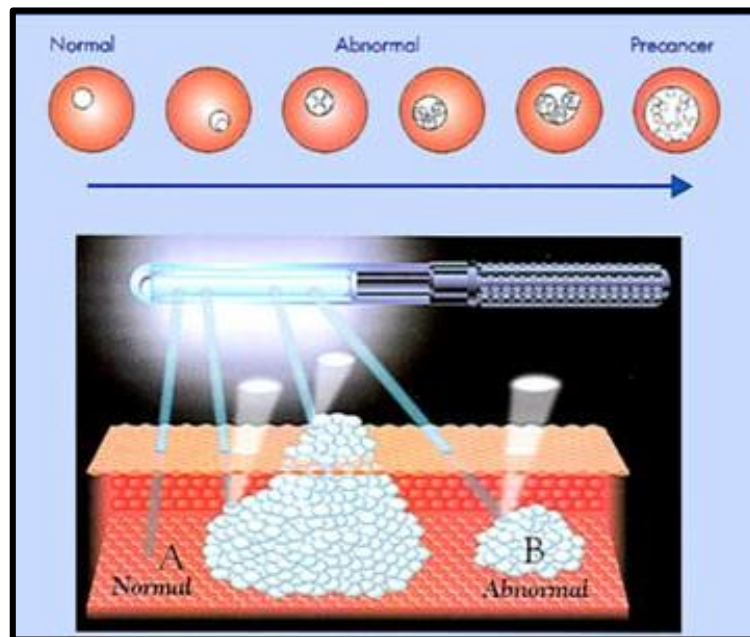


Figura 13 - Florescência dos tecidos (Nair et al., 2012)

Nenhum destes dispositivos é considerado um método de diagnóstico e nenhum dos fabricantes afirma que o dispositivo tenha sensibilidade ou especificidade para qualquer tipo de lesão anómala da cavidade oral (Mehrotra & Gupta, 2011; Patton, Epstein, & Kerr, 2008).

- ViziLite Plus

O paciente tem de primeiro bochechar com ácido acético 1% durante 30 segundos, para que os locais com proliferação epitelial e alterações estruturais dos núcleos reflitam uma energia luminosa de baixa intensidade quando estimulados por uma vara de luz quimioluminiscente descartável (Kerr & Shah, 2013; Mehrotra & Gupta, 2011; Patton, Epstein, Ross, et al., 2008).

- Microlux DL

Semelhante ao ViziLite, no entanto usa um dispositivo de luz diferente, com um díodo emissor de luz (LED) que gera uma luz azul-branca que depois é guiada para uma fibrótica, criando uma luz azul de baixa energia (Kerr & Shah, 2013; Mehrotra & Gupta, 2011; Patton, Epstein, & Kerr, 2008).

- Orascope DK

O sistema consiste numa solução de ácido acético e de um dispositivo LED com três acessórios acopláveis, em que um deles foi especialmente desenvolvido para a detecção de lesões malignas em estados pouco evoluído (Mehrotra & Gupta, 2011; Patton, Epstein, & Kerr, 2008).

- VELscope

O uso da autofluorescência dos tecidos como método de rastreio e de diagnóstico em lesões pré-cancerígenas do pulmão, colo do útero e pele está bem documentado na literatura (Messadi, 2013).

O VELscope consiste num método simples e rápido de usar, com um dispositivo portátil que usa uma luz visível num comprimento de onda entre 400 e 460 nm de forma a excitar certos compostos do tecido (moléculas como a FAD e NADH presentes no epitélio e colagénio e elastina presentes na submucosa), promovendo a fluorescência das lesões orais (Kerr & Shah, 2013; Mehrotra & Gupta, 2011; Patton, Epstein, & Kerr, 2008). A mucosa oral saudável reflete um verde pálido e as lesões displásicas e malignas aparecem mais escuras (Messadi, 2013).



Figura 14 - Lesão de displasia epitelial com perda de fluorescência (Kerr & Shah, 2013)

c) Saliva como ferramenta de diagnóstico

A saliva tem sido utilizada como um novo método de obtenção de biomarcadores moleculares de cancro oral (Elashoff et al., 2012; Messadi, 2013; Shpitzer, Bahar, Feinmesser, & Nagler, 2007).

A análise da saliva surge como uma alternativa não invasiva à análise do soro sanguíneo e pode vir a ser utilizada para o diagnóstico e prognóstico do cancro oral, bem como para a monitorização do estado de saúde pós-terapêutico (Mehrotra & Gupta, 2011). No entanto, devido à falta de conhecimento dos marcadores da doença e devido à baixa concentração destes na saliva, quando comparados com os do soro, o valor de diagnóstico da saliva ainda não está plenamente concretizado. Hoje em dia já existem, contudo, dispositivos altamente sensíveis, capazes de medir biomarcadores em baixas concentrações na saliva, expandindo assim a utilidade da saliva como uma ferramenta de diagnóstico (Messadi, 2013).

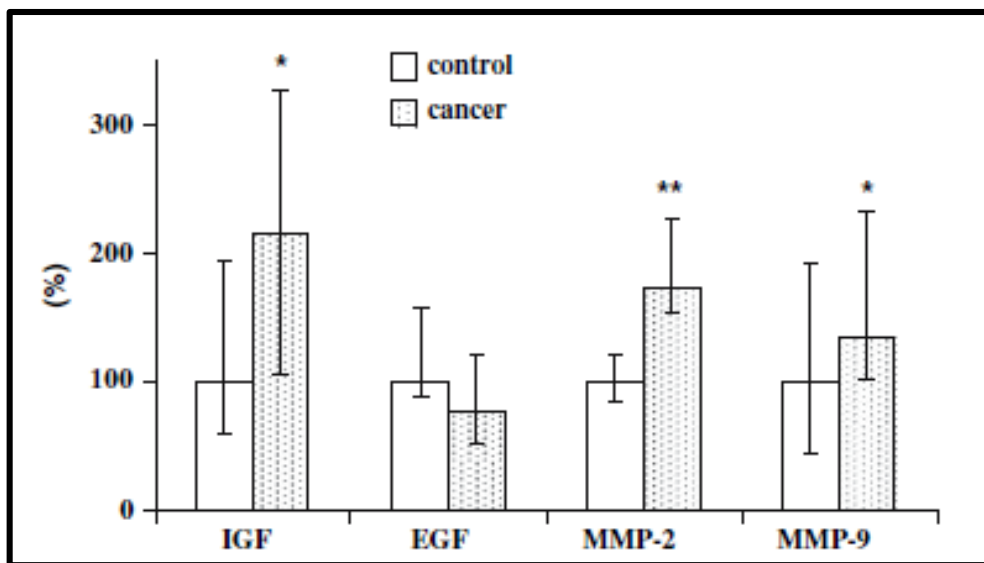


Figura 15 - concentrações salivares de alguns biomarcadores (Shpitzer et al., 2007)

d) Citopatologia

Consiste no estudo microscópico de amostras de células colhidas da superfície da mucosa, através de esfregaços, raspagens e lavagens ou de localizações mais internas através da aspiração com agulhas finas (Kerr & Shah, 2013; Patton, Epstein, & Kerr, 2008).

A análise de células epiteliais superficiais da cavidade oral ou orofaringe através de citologia exfoliativa comum é considerada falível, uma vez que é impossível aceder às camadas de células mais profundas da mucosa da cavidade oral (Mehrotra & Gupta, 2011).

○ Biopsia de escovagem - OralCDx®

Surgiu na década de 80 e era inicialmente utilizado por ginecologistas para esfregaços em lesões ginecológicas, foi posteriormente modificado e adaptado para esfregaços na cavidade oral. Utiliza uma escova especial com capacidade de recolher amostras de células em toda a espessura do epitélio. É um teste passível de se realizar na cadeira do consultório dentário, fácil de executar, sem dor para o paciente e que, portanto, pode ser utilizado para avaliar qualquer lesão suspeita (Kerr & Shah, 2013; Mehrotra & Gupta, 2011; Patton, Epstein, & Kerr, 2008).

Na recolha das amostras pode utilizar-se o azul de toluidina para ajudar a determinar o local ideal para a escovagem da lesão. Após a colheita estas amostras são fixadas numa lâmina de vidro e enviadas para o laboratório onde se procede à coloração com um teste de Papanicolaou modificado. São depois examinadas microscopicamente através de imagem processada a computador (*computer based imaging*), que permite classificar as células com base na sua anormalidade morfológica. Um citopatologista analisa os resultados obtidos e classifica-os como “negativo ou benigno”, “positivo” (quando há evidência concreta de displasia ou carcinoma) e “atípico” (definido como alterações epiteliais anormais de significado incerto). Baseado nesses resultados são dadas instruções específicas ao clínico relativamente à necessidade de efetuar biopsia, repetir a escovagem ou manter o paciente sobre observação (Mehrotra & Gupta, 2011; Patton, Epstein, & Kerr, 2008).

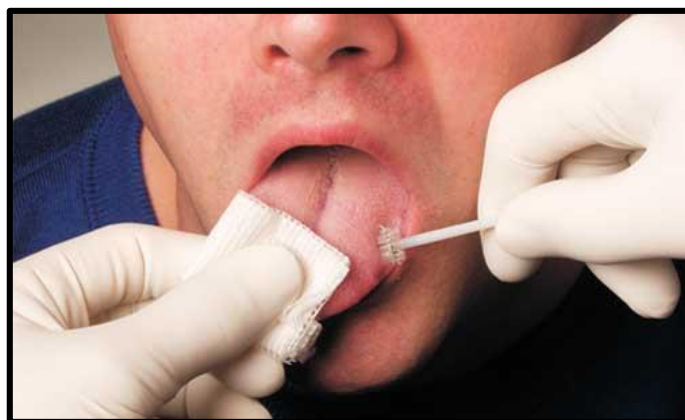


Figura 16 - Utilização da escova do sistema de biopsia de escovagem OralCDx® (Nair et al., 2012)

A biopsia de escovagem tem uma alta sensibilidade e especificidade para descartar a presença de displasia e de cancro, tornando-se uma forma prática de avaliar as lesões, sem uma etiologia óbvia, como infecção ou trauma (Mehrotra & Gupta, 2011).

A utilização da citometria de imagem do DNA, da análise das regiões organizadoras do nucléolo com afinidade para a prata (AgNOR), e da análise de células multimodal em conjunto com a análise citopatológica da biopsia de escovagem tem vindo a aumentar significativamente a precisão deste diagnóstico (Mehrotra & Gupta, 2011).

e) **Biopsia e análise histopatológica**

A biopsia seguida de análise histopatológica mantém-se como *golden standard* no diagnóstico de lesões pré-malignas e malignas da cavidade oral. Apresenta no entanto algumas limitações das quais o clínico deve estar a par: definições histopatológicas vagas, más interpretações histopatológicas com grande variabilidade inter e intra observadores. A biopsia é um processo invasivo e mutilante que pode por vezes ter implicações psicológicas para o paciente e em casos mais extremos pode apresentar dificuldades técnicas para o clínico. As amostras podem ser afetadas por artefactos resultantes de esmagamento, incorreta fixação e congelamento. (Mehrotra & Gupta, 2011; Nair et al., 2012)

O uso da técnica incisional ou excisional, mantém-se um tema controverso, no entanto a técnica de *punch biopsy* aparenta ter mais benefícios. Em alguns estudos têm vindo a ser detectadas metástases de cancro das células escamosas orais e a presença de células tumorais na corrente sanguínea 15 minutos após biopsias incisionais. (Avon & Klieb, 2012; Mehrotra & Gupta, 2011)



Figura 17 - Utilização da *Punch biopsy* (Avon & Klieb, 2012)

2.1.4 Prognóstico

No tratamento do cancro da cabeça e pescoço é necessária uma rigorosa estratificação dos riscos, de forma a determinar o tipo e a extensão da terapêutica, bem como o desfecho clínico da doença. Existem fatores, para além dos que estão associados à classificação TNM (tumor, nódulos linfáticos e metástases), que influenciam a resposta à terapêutica e o desfecho da doença. Estes fatores de prognóstico (FP) podem ser divididos em quatro categorias:

1. FP associados ao tumor primário
2. FP associados aos nódulos linfáticos cervicais
3. FP associados a dados demográficos
4. FP associado à saúde geral do paciente

Para além destes fatores clínicos e patológicos, estudos recentes têm vindo a revelar fatores moleculares que influenciam o desfecho da doença, demonstrando grande utilidade como FP biológicos (Smith & Haffty, 2009).

FP associados ao tumor primário

a) Dimensões do tumor

O estadiamento do tamanho do tumor (T) é determinado clinicamente medindo o maior diâmetro superficial da lesão. Este diâmetro tem sido considerado um fator de risco, importante para a presença de metástases nodulares concomitantes, recorrência e sobrevivência. A nível patológico, o diâmetro máximo do tumor é capaz de prever recorrências locais em cancros do lábio, cavidade oral, orofaringe e laringe. A maioria dos estudos demonstra uma associação entre o diâmetro tumor (clínico ou patológico) e a sobrevivência (Smith & Haffty, 2009). Num estudo realizado por Moore, Flynn, & Greenberg (1986), comparou-se a capacidade de prognóstico do diâmetro máximo do tumor com a sua espessura e chegou-se à conclusão de que a espessura é um melhor FP para metástases nodulares e sobrevivência do que o diâmetro superficial da lesão. Hoje em dia vários estudos corroboram esta afirmação, estabelecendo uma faixa de espessura crítica entre os 3-5mm. A utilização de tomografia computadorizada permite determinar o volume total do tumor, que é um FP muito eficaz, principalmente para cancros da laringe (Massano, Regateiro, Januário, & Ferreira, 2006).

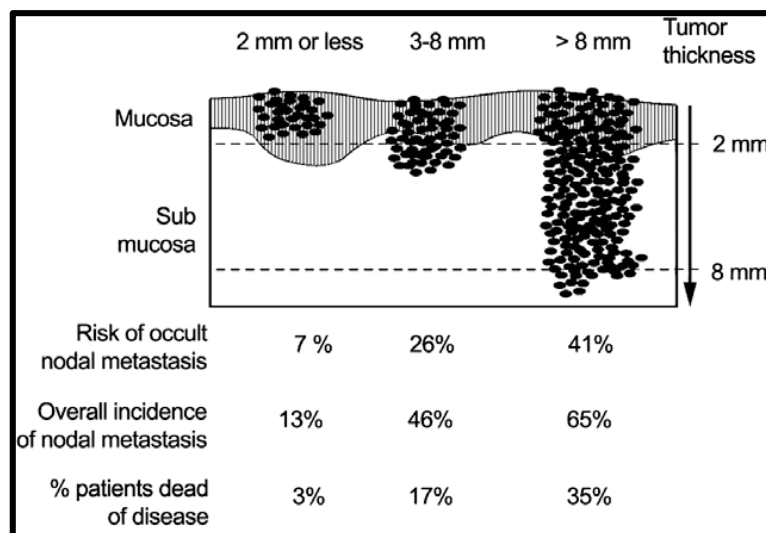


Figura 18 - Risco de metástases nodulares em relação à espessura do tumor primário (Shah & Gil, 2009)

b) Margens (positivas ou negativas)

A presença de carcinomas residuais nas margens cirúrgicas após ressecção (margens positivas) é um fator de risco importante para a recorrência local. A presença de margens positivas pode indicar um erro iatrogénico por parte do clínico durante a cirurgia de excisão, ou pode também indicar a presença de um tumor biologicamente mais agressivo, que se estende microscopicamente através dos feixes musculares, nódulos linfáticos submucosos e espaços perineurais. Margens positivas são FP para recorrência local ou loco-regional e também para fraca sobrevivência na maioria dos tumores de cabeça e pescoço (Smith & Haffty, 2009). Daí ser recomendado o uso de radioterapia pós-operatória, sempre que existam margens positivas, complementando com quimioterapia (cisplatina 100mg/m² nos dias 1, 22 e 43), para evitar a recorrência loco-regional e aumentar a taxa de sobrevivência (Bernier et al., 2005).

c) Malignidade

Os patologistas têm vindo a relacionar o grau das anormalidades morfológicas nas células com carcinomas e a sua capacidade de prognóstico (Smith & Haffty, 2009).

Bryne et al (1989) desenvolveram um sistema de classificação das células invasivas (ICG – *invasive cell grading*), que revelou ser um FP altamente eficaz na previsão da sobrevivência, presença de metástases cervicais ocultas e extensão extracapsular. Os pacientes com resultados de malignidade total entre 5 e 10 apresentaram uma taxa de

57% de sobrevivência em 5 anos, enquanto que os paciente com malignidade total maior que 10, apresentaram taxas de sobrevivência em 5 anos de 19%

d) Invasão perineuronal (PNI)

A infiltração dos espaços perineuronais pode ocorrer em 52% dos cancros da cabeça e pescoço. PNI pode resultar em disfagia secundária, associada ao tronco do nervo vago ou dor e parestesias, quando associada aos nervos glossofaríngeo e trigémio. Vários estudos revelam que a PNI é um importante FP, e que, quando presente, está associada a elevado risco de metástases dos nódulos linfáticos regionais, elevadas taxas de recorrência e fraca sobrevivência (Massano et al., 2006; Smith & Haffty, 2009).

e) Invasão vascular (IV)

A invasão vascular define-se pela presença de epitélio neoplásico no revestimento endotelial dos vasos sanguíneos. Surge em mais de 50% dos tumores da cabeça e pescoço. Como FP, é capaz de identificar carcinomas com características biológicas agressivas e está relacionado com a presença concomitante de metástases cervicais, risco aumentado de recorrência local e loco-regional nos cancros da cavidade oral, orofaringe e laringe (Smith & Haffty, 2009). A IV está também associada a um elevado risco de metástases à distância podendo, no entanto, a radioterapia pós-operatória atenuar o mau prognóstico associado à invasão vascular (Hinerman et al., 2004).

FP associados aos nódulos linfáticos cervicais

a) Número de nódulos linfáticos positivos

O número, tamanho e localização dos nódulos linfáticos positivos definem o estadiamento N e fornecem informações importantes sobre o prognóstico e a seleção da terapêutica. O número de nódulos linfáticos histopatologicamente positivos (NLP) para carcinoma das células escamosas é um dos FP mais simples e importante no cancro da cabeça e pescoço (Massano et al., 2006; Smith & Haffty, 2009). Em vários estudos foi comprovada a importância do número dos nódulos linfáticos positivos, estando este correlacionado com o risco de recorrência regional e de metástases à distância. A taxa

de sobrevivência também se encontra relacionada com o NLP e os pacientes com este FP têm indicação para uma terapêutica mais agressiva (Smith & Haffty, 2009).

b) Extensão extracapsular (ECE)

Ocorre aproximadamente em 60% dos casos com NLP e tem uma elevada importância na previsão do desfecho da doença. Pode ser dividida em três categorias:

- Disseminação extracapsular macroscópica envolvendo as estruturas anatómicas adjacentes (ex. veia jugular interna, musculo esquelético)
- Disseminação extracapsular macroscópica limitada à zona perinodular
- Disseminação extracapsular microscópica

(Woolgar, 2006)

Como FP, a disseminação extracapsular está intimamente relacionada com o aumento do risco de recorrência no pescoço e de metástases à distância. Pacientes com ECE apresentam um risco seis vezes mais elevado para a morte em relação a pacientes sem envolvimento nodular, e 3 vezes maior em relação a pacientes com envolvimento nodular mas sem ECE. Em termos de terapêutica, é recomendável optar por doses mais elevadas de radiação pós-operatória e complementar com quimioterapia, de forma a melhorar o controlo loco-regional e a taxa de sobrevivência (Massano et al., 2006; Smith & Haffty, 2009).

c) Localização do nódulo

Existem cinco níveis anatómicos onde os NLP se podem localizar:

- Nível I Nódulos dentro dos triângulos submandibular e submentoniano
- Nível II Nódulos no terço superior da veia jugular
- Nível III Nódulos no terço médio da veia jugular
- Nível IV Nódulos no terço inferior da veia jugular
- Nível V Nódulos em redor do nervo espinhal acessório e no triângulo cervical posterior (Spiro, Alfonso, Farr, & Strong, 1974)

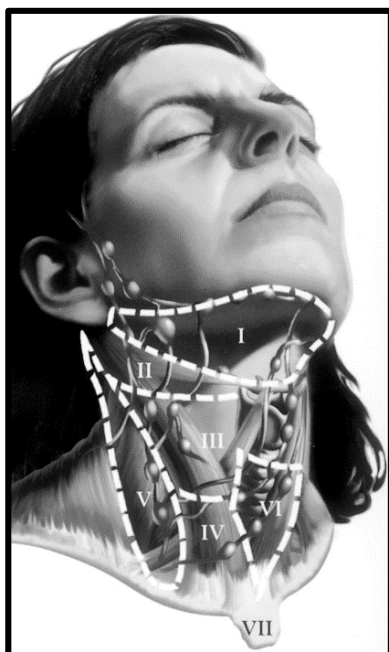


Figura 19 - Níveis dos nódulos linfáticos (Patel & Shah, 2005)

Os nódulos linfáticos sentinelas são grupos de nódulos responsáveis pela drenagem primária de algumas regiões da cabeça e pescoço. Os nódulos sentinelas da cavidade oral encontram-se nos níveis I, II e III, ao passo que os nódulos sentinelas, para as regiões da orofaringe, laringe e hipofaringe, encontram-se nos níveis II e III (Smith & Haffty, 2009). A presença de nódulos linfáticos positivos fora das regiões sentinela é considerado um FP, diminuindo para metade a taxa de sobrevivência em 5 anos e aumentando drasticamente o risco de metástases à distância (Mamelle et al., 1994).

d) Tamanho do nódulo

Mamelle et al (1994) determinaram num estudo que o tamanho do nódulo está relacionado com o aumento do risco para metástases à distância.

- Diâmetro nodular (DN) <3cm – Taxa de metástases à distância de 22%
- DN 3-6cm – Taxa de metástases à distância de 35%
- DN > 6cm – Taxa de metástases à distancia de 49%

FP associado à saúde geral do paciente

a) Comorbilidade

A comorbilidade é definida pela presença de doenças ou condições de saúde que não estão diretamente relacionadas com o cancro. Apesar de não estar incluída na classificação TNM, a comorbilidade tem uma elevada influência no tratamento dos pacientes, na seleção das diferentes modalidades terapêuticas e na avaliação dos resultados. Vários estudos comprovam que a comorbilidade é um importante FP em termos de sobrevivência: Pacientes sem comorbilidade apresentam uma relação de mortalidade de 1:9 para pacientes com comorbilidade moderada e 2:5 em relação a pacientes com comorbilidade severa (Massano et al., 2006; Smith & Haffty, 2009).

Dada a importância da comorbilidade como indicador de sobrevivência, tem-se vindo a implementar um novo sistema de classificação TNM complementado pela severidade dos sintomas e índices comorbilidade. Este novo sistema de classificação permite efetuar um prognóstico mais preciso (Ribeiro, 2000).

b) Nutrição

A má nutrição é extremamente comum nos pacientes com cancro de cabeça e pescoço estando quase sempre associada a maus hábitos nutricionais, consumo excessivo de álcool, efeitos locais do tumor, caquesia induzida pelo tumor e/ou os efeitos das diversas terapias (Smith & Haffty, 2009).

Goodwin & Torres (1984) formularam um índice de prognóstico nutricional baseado numa série de parâmetros relacionados com a nutrição e chegaram à conclusão de que os pacientes com índices nutricionais >39%, 89% sofreram complicações pós-operatórias e 64% morreram passado um ano. Admite-se portanto que a nutrição é um FP importante relativamente às complicações pós-operatórias e à sobrevivência.

c) Anemia

A anemia ocorre muito frequentemente em cancros de cabeça e pescoço e pode estar associada a uma série de causas, tais como, comorbilidade, perda de sangue durante a operação, toxicidade devido à radio ou quimioterapia ou doença crónica. Vários estudos comprovam que a anemia está relacionada com recorrência loco-regional e sobrevivência (Smith & Haffty, 2009).

FP associados a dados demográficos

a) Idade

Idade é uma co variável que influencia o desfecho em certos tipos de cancro. A idade avançada do paciente e possível comorbilidade pode influenciar o vigor da resposta imunitária contra o tumor, bem como capacidade do doente suportar certas modalidades terapêuticas. A presença de cancro da cabeça e pescoço em pacientes mais novos ou mais idosos pode resultar de diferentes agentes etiológicos e, portanto, manifestar diferentes desfechos clínicos. Apesar dos pacientes mais idosos com cancro da cabeça e pescoço, poderem apresentar diferentes fatores de risco e estarem em maior risco de morte por comorbilidade, não estão em maior risco de morte pelo cancro e devem sempre receber tratamento curativo quando possível (Massano et al., 2006; Smith & Haffty, 2009).

b) Sexo

O sexo não é normalmente considerado como um indicador significativo de sobrevivência em pacientes com cancro de cabeça e pescoço (Massano et al., 2006; Smith & Haffty, 2009).

c) Raça

A mortalidade do cancro de cabeça e pescoço em indivíduos de raça negra é maior, no entanto esta situação parece estar mais associada ao facto desta população ser mais carenciada e por isso ter maiores dificuldades de acesso a serviços de saúde. Estudos revelam que não há diferenças particulares em termos de agressividade biológica entre cancros de cabeça e pescoço em indivíduos de raça negra ou caucasiana (Gourin & Podolsky, 2006).

FP moleculares

As células cancerígenas resultam de perturbações nos circuitos que regulam a proliferação e a homeostasia das células normais. Apesar de várias alterações genéticas

estarem associadas a vários tipos de cânceros, há 4 modificações típicas na fisiologia celular que, de acordo com sua função, se dividem em:

- Potenciadores do crescimento do tumor: aceleração do ciclo celular e proliferação
- Supressão do tumor e defesas anti-tumor: resposta imune e apoptose,
- Angiogénese,
- Invasão tumoral e potencial metastático: moléculas de adesão e de degradação da matriz.

(Schliephake, 2003; Smith & Haffty, 2009)

O estudo destas alterações moleculares é importante para a caracterização das células cancerígenas, podendo ser útil na deteção do risco individual e familiar, no diagnóstico precoce não-invasivo, no estadiamento do tumor, na terapêutica, e no prognóstico. Apesar de existirem diversos estudos sobre biomarcadores moleculares em tumores malignos, para o cancro oral existem relativamente poucos (Schliephake, 2003).

a) Potenciadores do crescimento do tumor:

- **Recetor do Fator de Crescimento Epitelial (EGFR)**
 - proto-oncogene 7p13-Q22 codifica uma proteína transmembranar que, quando ativada pelo fator de crescimento epidérmico (EFG) ou fator de crescimento transformante alfa (TGF α), desencadeia uma cascata de processos bioquímicos envolvidos na proliferação, diferenciação e migração e nos mecanismos anti-apoptóticos celulares. Parece desempenhar um papel importante na proliferação, sobrevivência e mobilidade das células cancerígenas. A sua sobre-expressão é comum em muitos tumores malignos, correlacionando-se com mau prognóstico. No cancro oral, este biomarcador, tem sido frequentemente associado com estadio T avançado, tumores invasivos difusos, e elevada incidência de metástases nos nódulos cervicais (Massano et al., 2006; Schliephake, 2003; Smith & Haffty, 2009).
- **Ciclina D1**

- Proto-oncogene que regula o ciclo celular, promovendo a transição $G1 \rightarrow S$. A atividade da ciclina D1 é inibida por vários genes supressores de tumores (p16, p21 e p27). A sobre-expressão deste gene é um fator independente de prognóstico em diversos tumores, incluindo o de cabeça e pescoço. O aumento da expressão da ciclina D1 está associado com a presença de metástases nodulares regionais e de tumores avançados, embora alguns autores considerem estes dados controversos (Massano et al., 2006; Schliephake, 2003; Smith & Haffty, 2009).
- **Ciclina A**
 - A ciclina A é crucial para a síntese do DNA nas fases S e $G2 \rightarrow M$, a sua sobre-expressão está correlacionada com um pior prognóstico em diversos tumores. Elevados índices de ciclina A apresentam correlação com estados avançados da doença, maior volume tumoral, metástases e recorrência. Pacientes com mais de 15% de células ciclina A positivas apresentam uma sobrevivência mais curta, do que aqueles com valores mais baixos (Massano et al., 2006; Schliephake, 2003).
- **Ki67/MIB**
 - Ki67 é um anticorpo monoclonal que se liga a uma proteína que é expressa nas fases G1, S e na fase G2 e MIB é um anticorpo monoclonal contra a mesma proteína nuclear, que pode ser utilizada em tecidos fixados em formol.
Ambos os marcadores estão aumentados em tecidos de proliferação (Massano et al., 2006; Schliephake, 2003).
- **AgNOR** (*Argyrophilic nucleolar organizer region associated proteins*)
 - As regiões organizadoras de nucléolo (NORs) são hansas de DNA que transcrevem RNA ribossomal e estão associadas a proteínas. Estas proteínas podem ser coradas com prata, indicando zonas de proliferação celular (Massano et al., 2006; Schliephake, 2003).
- **Outros biomarcadores:**
 - Proliferação Celular do Antígeno Nuclear (PCNA)
 - Skp2
 - bcl2/BAG-1
 - Proteínas de choque térmico (HSP27 e HSP70)

- Telomerasas

b) Supressão do tumor e resposta anti-tumor

- **Proteína retinoblastoma (pRb)**
 - A sua mutação ou a diminuição de atividade faz com que ocorra uma proliferação celular descontrolada. No cancro oral a sua relação com o prognóstico não está bem estabelecida (Massano et al., 2006; Schliephake, 2003). No entanto, Takes et al.(2002) relataram uma associação entre a perda de expressão do gene Rb e uma maior probabilidade de metástases nodulares.
- **Ciclina dependente dos inibidores de quinase (CDKIs)**
 - p16 - Interrompe a progressão do ciclo celular em G1. Influencia a sobrevivência, as taxas de recorrência e a presença de metástases nodulares.
 - p21 - A expressão de p21^{WAF1/CIP1} está inversamente correlacionada com os parâmetros T e o estadiamento clínico, mas não com os parâmetros N, diferenciação do tumor, ou variáveis apoptóticas. Pacientes com tumores que expressam valores mais elevados de p21^{WAF1/CIP1} têm maior sobrevida.
 - p27 – A sua baixa expressão tem sido correlacionada com um pior prognóstico em diversos tumores humanos, incluindo o cancro oral.
 - p34: regula a entrada da célula em mitose, é considerada um índice de proliferação celular. No cancro da língua, p34cdc2 positivo é indicador de uma baixa sobrevivência.
(Massano et al., 2006; Schliephake, 2003)
- **p53**
 - A p53 é um fator de transcrição com uma função supressora do tumor, que regula o ciclo celular e serve para proteger a integridade do genoma. A ativação da p53 ocorre devido a uma variedade de fatores de stress celular, tais como danos no DNA, hipoxia e alterações no ciclo celular. Esses fatores conduzem a um aumento dos níveis da proteína p53, podendo resultar em vários eventos celulares diferentes, como paragem na fase G1, apoptose ou senescência. A proteína P53 protege, portanto, a

célula da propagação de mutações às gerações celulares seguintes, sendo inclusivamente descrita por alguns autores como a “guardiã do genoma” (Massano et al., 2006; Schliephake, 2003; Smith & Haffty, 2009).

A perda da função da p53 contribui para a agressividade do tumor, promovendo uma maior resistência à radiação e quimioterapia, acelerando o crescimento em condições de hipoxia e aumentando a neovascularização do tumor (Smith & Haffty, 2009).

A p53 é um marcador interessante para a terapia genética, algumas experiências já foram conduzidas utilizando vetores adenovirais e alcançaram-se resultados encorajadores (Massano et al., 2006).

- **Outros biomarcadores**

- Bax
- Fas / FasL
- Cadeias Zeta
- Células dendríticas S100/p55

c) Angiogénese

- **VEGF / VEGF-R** (fator de crescimento endotelial vascular / recetor)

- A VEGF desempenha um papel decisivo no desenvolvimento dos vasos sanguíneos, sendo uma componente chave na angiogénese do tumor. Existem quatro subtipos (A, B, C e D). Shintani et al (2004) correlacionaram os subtipos A e B com a angiogénese do tumor e os subtipos C e D com o risco de metástases nodulares e um possível papel no processo de invasão e desenvolvimento de metástases. Noutro estudo obteve-se uma forte correlação entre a elevada expressão da VEGF no cancro oral e um pior prognóstico (Massano et al., 2006).

- **Outros biomarcadores:**

- NOS2 (óxido nítrico sintase tipo II)
- Fator de crescimento de células endoteliais derivado de plaquetas (PD-ECGF)

d) Tumor invasivo e potencial metastático

- **Caderinas e cateninas**

- As caderinas (E e P), são proteínas integrais da membrana e atuam como proteínas de adesão, formando complexos com proteínas intracelulares (cateninas β e γ). A expressão destas moléculas mostrou uma relação inversa com a diferenciação do tumor (Massano et al., 2006; Schliephake, 2003).
- **Outros biomarcadores:**
 - Matrix-metalo-proteases (MMP)
 - catepsinas
 - integrinas
 - Desmoplaquina / placoglobina
 - Ets-1

2.1.5 Terapêutica:

Tratamento dos distúrbios potencialmente malignos:

A maioria dos PMD são assintomáticos e o principal objetivo do tratamento é prevenir e/ou detetar o desenvolvimento de cancro, precocemente. Podemos dividir o tratamento dos PMD em 3 categorias: observação, excisão cirúrgica e tratamento médico. (Lodi & Porter, 2008; Nair et al., 2012)

a) Observação:

Lesões pequenas detectadas precocemente, sem características clínicas de malignidade e em locais favoráveis, podem ser mantidas sobre observação. O paciente deve ser informado sobre a possibilidade de malignização e de que necessita manter um regime de consultas de *follow-up* para se vigiar a evolução da lesão. (Lodi & Porter, 2008; Nair et al., 2012)

b) Tratamento médico:

Até à data, não existe evidência de um tratamento médico/não cirúrgico eficaz na prevenção da progressão de lesões displásicas para carcinoma células escamosas. Várias substâncias têm sido utilizadas neste tipo de terapêutica, tais como vitamina A sistémica, beta caroteno sistémico, licopeno e bleomicina local. Normalmente as taxas de recorrência são altas entre os que inicialmente responderam ao tratamento médico.

c) Excisão cirúrgica conservadora:

A ressecção cirúrgica é realizada para remover áreas com elevado risco de progredirem para um carcinoma, sendo normalmente a primeira escolha no tratamento da leucoplasia, apesar de não estar comprovado que a remoção das lesões orais potencialmente malignas possa prevenir o aparecimento de cancro oral (Lodi & Porter, 2008; Nair et al., 2012). Além disso, por vezes não é possível remover toda a área diagnosticada histologicamente com displasia, pois em casos de lesões mais extensas, o procedimento levaria a uma morbilidade tal que não justifica os benefícios para o paciente. Esta incapacidade de remover todas as lesões pré-malignas deve-se ao facto de os agentes carcinogénicos atuarem numa área alargada da cavidade oral, provocando lesões muito amplas (Nair et al., 2012). No entanto, mesmo não existindo evidência de que a incidência do carcinoma oral possa diminuir através da remoção cirúrgica da leucoplasia, não se pode menosprezar o papel da biópsia excisional como ferramenta de diagnóstico na prevenção secundária ou seja, na deteção de lesões de cancro muito precoce, por vezes não detetado por biópsia incisional (Avon & Klieb, 2012; Lodi & Porter, 2008).

d) Excisão a laser:

Este método apresenta algumas vantagens sobre o método convencional (bisturi), tais como redução do efeito de cicatriz, diminuição da dor e inchaço pós-cirúrgico, e menor risco de infeção. Em contrapartida apresenta a grande desvantagem de não ser possível recolher amostras de tecido para análise histopatológica. Existem vários tipos de lasers, o de CO₂, o NdYAG e o KTP, cada um com diferentes taxas de recorrência, 34,2%, 28,9% e 17,0%, respetivamente (Avon & Klieb, 2012; Lodi & Porter, 2008; Nair et al., 2012).

e) Criocirurgia:

Parece não apresentar qualquer tipo de benefício, com taxas de recorrência de 20-71.4% e taxas de malignização de 7-25% (Lodi & Porter, 2008; Nair et al., 2012).

f) Terapia fotodinâmica:

Consiste noutro método de excisão, que está a ser investigado para o tratamento dos PMD. Um agente fotossensibilizante (derivados de hematoporfirina ou 5-ALA), administrado por via intravenosa ou por via tópica, liga-se preferencialmente às células neoplásicas. O tecido alvo é depois irradiado com uma luz num comprimento de onda específico; esta luz ativa o fotossensibilizador, gerando “*reactive oxygen species*”

localmente, destruindo o tecido neoplásico. Vários estudos apresentaram resultados promissores no tratamento de lesões epiteliais pré-malignas e carcinomas superficiais. O principal efeito secundário deste novo método é a fotossensibilidade cutânea; no entanto novos agentes fotossensibilizantes, como o 5-ALA já não apresentam efeitos secundários tão severos (Nair et al., 2012).

Tratamento do cancro da cavidade oral:

A grande maioria dos cancros que envolvem a cavidade oral são carcinomas de células escamosas. Estes cancros da cavidade oral podem ser tratados com radioterapia, cirurgia ou terapia combinada. A terapia única é geralmente tentada numa fase inicial, enquanto que para tumores mais avançados é geralmente empregada terapia combinada (Genden et al., 2010).

a) Doença precoce:

Carcinomas superficiais da cavidade oral podem ser tratados com taxas de cura equivalentes com radioterapia (externa ou intersticial) ou com excisão cirúrgica. A escolha da terapêutica baseia-se frequentemente em fatores, tais como a preferência do paciente, qualidade de vida, custo, conveniência e a adesão à terapêutica. Como o tratamento cirúrgico pode ser alcançado rapidamente e com uma morbilidade mínima, a cirurgia é muitas vezes escolhida como terapêutica em cancros precoces da cavidade oral. Embora a radioterapia seja igualmente eficaz no tratamento da doença numa fase inicial, a probabilidade de desenvolver sequelas a longo prazo, incluindo a xerostomia, disfagia e osteorradionecrose é tal que o tratamento de escolha será, na maioria dos casos, a cirurgia (Genden et al., 2010; Shah & Gil, 2009). Outra vantagem da cirurgia é a menor duração do tratamento, pois esta requer uma única intervenção enquanto que a radioterapia necessita de 6-7 semanas de terapia diária. A radioterapia está indicada para pacientes que não possam ser submetidos a cirurgia. A terapia fotodinâmica, referida anteriormente, também pode ser utilizada como alternativa ao tratamento cirúrgico (Genden et al., 2010; Nyst, Tan, Stewart, & Balm, 2009).

b) Doença avançada:

Nos cancros orais avançados a utilização de terapêuticas combinadas é altamente recomendável. A cirurgia, com ou sem reconstrução é acompanhada de radioterapia (pré-operatória ou pós-operatória) em fases mais avançadas da doença (Genden et al., 2010).

A radiação pré-operatória tem sido utilizada em alguns casos, para reduzir a massa e facilitar remoção do tumor. No entanto, durante a cirurgia por uma questão de segurança, utilizam-se as margens iniciais do tumor. Acontecendo que as cirurgias com radioterapia pré-operatória, apresentam maiores complicações pós-cirúrgicas, a maioria dos profissionais optam por radioterapia pós-operativa (Genden et al., 2010).

Estudos recentes revelam que quimioradioterapia como primeira abordagem terapêutica, em cancros orais avançados (t4 – tumor massivo maior que 4cm e com invasão de estruturas adjacentes), pode ser viável, pois apresenta índices de controlo loco-regional, de sobrevivência e de complicações comparáveis com os que estão associados com o tratamento cirúrgico primário e radioterapia pós-operatória. Outra razão para se optar pela quimioradioterapia como primeira abordagem terapêutica prende-se com o facto de esta ser menos mutilante do que algumas cirurgias (ex. glossectomia total) (Cohen et al., 2009).

A radioterapia pós-operatória está indicada para pacientes com elevado risco de recorrência, havendo no entanto alguma controvérsia na definição destes pacientes de alto risco. Nos casos em que há envolvimento do pescoço, com estadiamento N2 ou maior, ou quando o exame histopatológico apresenta características desfavoráveis (ex. invasão capsular da metástase nodular), a radioterapia pós-operatória é justificada. Deve-se complementar a terapêutica com quimioterapia (Cisplatina) na presença de margens positivas nas amostras de ressecção do tumor primário, múltiplo envolvimento ganglionar ou disseminação extracapsular na amostra do pescoço (Genden et al., 2010).

2.2 ELEMENTOS VESTIGIAIS:

Dos 116 elementos presentes na tabela periódica, 11 representam 99.5% do número total de átomos presentes no corpo humano. Desses 11 elementos, 4 - carbono (C), oxigénio (O), hidrogénio (H) e nitrogénio (N) - compõem cerca de 96% do corpo humano. Os restantes 3.5% são considerados os elementos major, e são eles, o sódio (Na), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), fósforo (P), enxofre (S) e cloro (Cl)

(Frieden, 1972). Os restantes elementos são considerados elementos vestigiais (*trace elements*), definidos em biologia como elementos necessários em quantidades muito reduzidas para um adequado crescimento e desenvolvimento fisiológico do organismo, representam 0.5% do número total de átomos no corpo humano (Bowen, 1976; Frieden, 1972).

Elementos essenciais e não essenciais:

Os elementos vestigiais considerados pela Consulta de Especialistas da Organização Mundial de Saúde (OMS) (*Trace elements in human nutrition and health*, 1996) foram divididos em três grupos tendo em conta a sua importância nutricional nos seres humanos:

Elementos essenciais	Iodo (I), zinco (Zn), selénio (Se), cobre (Cu), molibdénio (Mo), crómio (Cr), bromo (Br), ferro (Fe)
Elementos que são, provavelmente, essenciais	Manganês (Mn), silício (Si), níquel (Ni), boro (B), vanádio (V)
Elementos potencialmente tóxicos (podendo alguns, em concentrações extremamente baixas ter funções essenciais)	Fluoreto (F ⁻), chumbo (Pb), cádmio (Cd), mercúrio (Hg), alumínio (Al), arsénio (As), lítio (Li), estanho (Sn)

Tabela 1 - Classificação dos elementos vestigiais pela OMS

Um elemento químico é considerado essencial quando a sua carência provoca alterações no desenvolvimento e nas funções metabólicas do organismo. Para ser considerado um elemento essencial, deve cumprir quatro condições:

- A ingestão insuficiente do elemento provoca deficiências funcionais, reversíveis se o elemento voltar a ficar nas concentrações adequadas;
- Sem o elemento, o organismo não cresce, nem completa o seu ciclo vital;
- O elemento atua diretamente no organismo e está envolvido nos seus processos metabólicos;
- O efeito causado pelo elemento essencial não pode ser atingido por nenhum outro elemento

Os elementos não essenciais não apresentam qualquer função metabólica conhecida no organismo, podendo alguns ter carácter cumulativo e tóxico. Fornecidos a um organismo, em doses superiores a um dado valor, impedem ou prejudicam o seu desenvolvimento e as suas funções metabólicas, mesmo em baixas concentrações (*Trace elements in human nutrition and health*, 1996).

2.2.1 Elementos vestigiais e o seu papel no cancro

Vários estudos comprovam que o desequilíbrio na composição dos elementos vestigiais, sejam eles essenciais ou não, pode induzir um estado de doença no organismo. O metabolismo requer concentrações convenientes dos elementos vestigiais; no entanto quando as concentrações destes elementos variam, seja para valores mais elevados ou mais reduzidos, podem apresentar-se efeitos tóxicos (Mariana Silva et al., 2009; Marina Silva et al., 2012).

Os elementos vestigiais metálicos têm três mecanismos genotóxicos principais:

1. Interferência com a regulação redox celular, que causa lesões oxidativas do DNA ou desencadeia cascatas de sinalização que podem estimular o crescimento maligno
2. Inibição dos principais mecanismos de reparação do DNA podendo resultar em instabilidade genómica e acumulação de mutações.
3. Desregulada proliferação celular através da ativação das vias de sinalização ou inativação dos controlos de crescimento, tais como os genes supressores.

(Mulware, 2013)

Ferro

Testes em animais, injetados por via intramuscular com um dextrano de ferro, revelaram existir uma correlação entre o ferro e o desenvolvimento de sarcomas e cancros da pele. Pacientes com hemocromatose idiopática, em que há uma absorção exagerada de ferro, têm tendência para desenvolver tumores malignos em vários órgãos, principalmente no fígado. Existem dois mecanismos de hepatocarcinogénese associados ao Fe: um, em que o ferro se liga às proteínas de baixo peso molecular, gerando radicais livres hidroxilo que danificam o DNA e outro associado à ação direta do Fe na replicação do DNA. Num estudo comparativo entre pacientes com e sem cancro do fígado, foram detectadas maiores concentrações de ferro nos pacientes com cancro do fígado (Boffetta, 1993; Fukuda et al., 2004)

Cobre

Foram detectadas grandes acumulações de cobre no fígado e baço em pacientes com cancros no trato respiratório, urinário e no tórax, sendo os valores destas acumulações mais baixos em tumores benignos do que em malignos. Muitos estudos apontam para a inegável influência do cobre sobre a angiogénese; daí o cobre se ter tornado num dos alvos no tratamento angiogénico do cancro (Fukuda et al., 2004; Nasulewicz, Mazur, & Opolski, 2004). O papel angiogénico do cobre deve-se ao facto de este ser ativador de vários fatores angiogénicos como o VEGF, fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), factor de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina (IL) (Nasulewicz et al., 2004)

Zinco

Em estudos experimentais, em que as cobaias foram injetadas com cloreto de zinco, observou-se o desenvolvimento de teratomas e cancros. No entanto, até à data não há qualquer evidência da associação entre a ingestão e exposição ocupacional ao Zn com o risco de desenvolver cancro (Fukuda et al., 2004). O zinco é um dos componentes da superóxido dismutase (SOD), uma enzima que remove os radicais livres e é essencial para a ativação das enzimas de reparação do DNA. Pensa-se, portanto, que o Zn tenha um efeito protetor em relação à carcinogénese (Fukuda et al., 2004; Navarro Silvera & Rohan, 2007).

Arsénio

Num estudo refer-se o aparecimento de tumores na bexiga, rim, fígado, tireoide, pulmão e pele em que ratos e ratazanas expostos à acção de arsénio. Nos humanos a exposição crónica por via oral ou via aérea leva ao desenvolvimento de cancros da pele e do pulmão bem como a de lesões potencialmente malignas, como a queratose cutânea (doença de Bowen) (Fukuda et al., 2004). Há provas convincentes que correlacionam o risco de cancro do pulmão com os níveis altos e baixos de exposição ao arsénio e o risco de cancro da bexiga com níveis elevados de exposição. O mecanismo da carcinogénese é desconhecido, mas estudos *in vitro* relatam que os compostos de arsénio inibem a metil timidina e a síntese de DNA (Fukuda et al., 2004; Navarro Silvera & Rohan, 2007).

Crómio

Existe uma forte correlação entre a exposição ao cromo e a carcinogénese nos pulmões (Fukuda et al., 2004). Estudos comprovam uma elevada incidência de cancro do pulmão nos trabalhadores envolvidos na produção de cromatos («Chromium and Chromium compounds», 1987; Mulware, 2012).

Níquel

Estudos com gatos revelaram que após a inalação de pó de níquel, surgiam cancros do pulmão (Fukuda et al., 2004). Foram encontradas elevadas taxas de incidência de cancro do pulmão e da cavidade nasal em trabalhadores de refinarias de níquel (Boffetta, 1993; Mulware, 2012). Os compostos de níquel podem apresentar uma série de mecanismos de carcinogénese, incluindo a inibição da comunicação intercelular, a imortalização de células epiteliais e fibroblastos, a indução de deleções e aberrações de DNA, de danos oxidativos, a inibição da reparação por excisão de nucleótidos e um aumento da metilização do DNA que leva à inativação da expressão do gene (Navarro Silvera & Rohan, 2007).

Vanádio

Não é reconhecido pela sua atividade carcinogénica e não foi encontrada alguma associação com cancro em seres humanos ou animais. No entanto, o vanádio promove a mutação de algumas células, causa a fosforilação da tirosina-quinase, e possivelmente,

exerce algum efeito sobre os oncogenes durante a divisão celular, daí o risco de carcinogenicidade não poder ser descartado (Fukuda et al., 2004; «Vanadium Pentoxide», 1975).

Berílio

Estudos em animais com exposição ao berílio, nomeadamente através de inalação, revelam que este elemento é carcinogénico (Fukuda et al., 2004). No ser humano a agência internacional para o estudo do cancro (IARC) considerou o berílio como tendo evidência suficiente de carcinogenicidade em humanos, baseando-se na elevada mortalidade por cancro do pulmão e no aumento dos tumores do sistema nervoso central em trabalhadores de fábricas que lidam com berílio. Pensa-se que o mecanismo de carcinogénese do Be seja através da inibição de enzimas responsáveis pela síntese do DNA (timidina-sintase e polimerase de DNA) («Beryllium and beryllium compounds.», 2011).

Chumbo

Estudos em animais revelam que após a administração de chumbo, por diversas vias, surgiram tumores no rim, pulmão e cérebro (Fukuda et al., 2004). Foi descrita uma ligeira associação entre o desenvolvimento de cancro do pulmão, estômago, e cérebro em trabalhadores nas fundições de chumbo e até mesmo em casos de intoxicação por este metal. No entanto o chumbo não foi definitivamente comprovado como sendo carcinogénico para humanos («Lead and lead compounds», 2008).

Cádmio

Estudos em animais comprovam que o cádmio é um elemento carcinogénico, provocando tumores nos testículos e sarcomas (Fukuda et al., 2004). Com base nas evidências experimentais e estudos epidemiológicos realizados pela IARC e pelo Programa Nacional de Toxicologia dos EUA o Cd é considerado como um carcinogénico humano («Cadmium and cadmium compounds.», 2011). Existem fortes evidências de uma associação positiva entre a exposição ocupacional Cd e o risco de cancro do pulmão, rim e próstata. Pensa-se que os mecanismos de carcinogénese do Cd sejam os seguintes: Indução de quebras no DNA, inibição da reparação do DNA, ativação de protooncogenes e inibição da apoptose (Navarro Silvera & Rohan, 2007).

Selénio

O selénio é considerado um elemento essencial, pois é o componente primário das selenioproteínas que têm um papel na neutralização do stresse oxidativo e regulação das reações redox de outras moléculas. Os seus efeitos preventivos contra o cancro têm sido amplamente estudados, revelando uma associação inversa entre a exposição Se e o risco de cancro de próstata (Navarro Silvera & Rohan, 2007).

2.2.2 Investigação de elementos vestigiais em amostras biomédicas

A investigação dos elementos vestigiais em sistemas biológicos é uma tarefa multidisciplinar que envolve dois parâmetros cruciais, conhecimentos biológicos sobre as amostras a estudar e conhecimentos analíticos para o planeamento dos estudos (*Trace elements in human nutrition and health*, 1996).

Qualidade

Quando se lida com amostras biomédicas é necessário considerar dois aspetos muito importantes. O primeiro diz respeito às precauções necessárias a ter durante a análise de rotina, evitando a contaminação com substâncias extrínsecas e, se a análise não for realizada logo após a colheita, armazenar e preservar a amostra em condições adequadas. O segundo aspeto prende-se com as variáveis fisiológicas da amostra que podem influenciar os factores *presampling* e, conseqüentemente, a composição da amostra (Harris, 2010; Settle, 1997; *Trace elements in human nutrition and health*, 1996).

Factores pré amostra (factores *presampling*)

Os Factores *Presampling* são essencialmente fenómenos biológicos que influenciam a composição da amostra, incluindo variações biológicas (factores genéticos, influências fisiológicas de longo e curto prazo e mudanças sazonais), alterações *post-mortem* (edema, embebição e autólise celular), alterações intrínsecas (Ex. hemólise) e "contaminações" internas resultantes de medicamentos, implantes ou dietas pouco comuns (*Trace elements in human nutrition and health*, 1996).

Para minimizar os efeitos dos fatores *presampling* podem ser aplicadas diferentes técnicas de preservação da integridade da amostra, sendo elas:

- Escolha adequada do recipiente de armazenamento da amostra
- Adição de estabilizadores químicos, tais como antioxidantes e agentes antibacterianos
- Congelar a amostra para evitar a degradação térmica
- Adsorção numa fase sólida

(Settle, 1997)

Contaminação extrínseca

A relevância dos erros induzidos pela contaminação extrínseca das amostras está relacionada com a concentração da substância a analisar. Por exemplo, se 1,2 ng de zinco existe como contaminante numa amostra de plasma sanguíneo, a determinação do Zn na amostra não será afetada, pois há uma elevada concentração deste elemento no plasma sanguíneo. Por outro lado, se a quantidade introduzida fosse 0.2ng de crómio, já seria totalmente inaceitável, pois esta quantidade seria maior do que a que existe no plasma. Os procedimentos de controlo para contaminação extrínseca têm vindo a melhorar progressivamente, sendo a análise do crómio urinário um bom exemplo desse progresso; nos últimos anos a estimativa de excreção diária de cromo através da urina desceu de 7,2 pg/dia para 0,16. Outros fatores cruciais no controlo da contaminação são o tempo de armazenamento da amostra, antes da análise e o uso de recipientes e de instrumentos apropriados, feitos de materiais que não interferem na análise e ainda o controlo da humidade e do pó (Settle, 1997; *Trace elements in human nutrition and health*, 1996).

Armazenamento e preservação

A estabilidade de um elemento químico durante o armazenamento depende do tipo de matriz em que está inserido; daí ser importante preservar, quando possível, a amostra no seu estado natural. A preservação criogénica, processo em que as células, tecidos ou quaisquer outras substâncias são preservadas por arrefecimento a temperaturas negativas, é um dos métodos que garante que a amostra mantém a sua identidade bioquímica. O armazenamento das amostras para análise requer recipientes seguros, limpos, não contaminados e não degradáveis, tais como, frascos e garrafas de

polietileno ou de politetrafluoretileno (*Trace elements in human nutrition and health*, 1996).

Calibração dos sistemas analíticos

A calibração deve ser feita através da análise frequente de amostras chamadas *reference standards*¹, sendo essa a chave para eliminar inconsistências processuais no estabelecimento de uma análise de qualidade. Os *reference standards* utilizados devem ter uma matriz semelhante à da amostra a analisar e englobar todo o espectro de elementos presentes na amostra (Harris, 2010; Settle, 1997; *Trace elements in human nutrition and health*, 1996).

Os *reference standards* podem ser divididos em duas categorias:

Primários – são preparados e certificados por instituições de renome, sobre condições altamente rigorosas o que implica custos muito elevados, mas indispensáveis para validar novos métodos analíticos.

Secundários – são amostras criadas pelos próprios laboratórios, com base nos *reference standards* primários, e podem ser utilizados no controlo de qualidade.

(*Trace elements in human nutrition and health*, 1996)

2.2.3 Técnicas analíticas na investigação de elementos vestigiais

I. Espectrometria de Absorção Atômica (AAS)

É uma técnica amplamente utilizada e aceite, capaz de determinar as concentrações de elementos vestigiais ($\mu\text{g/mL}$) e ultravestigiais (sub- $\mu\text{g/mL}$) numa ampla variedade de amostras, sejam elas biológicas, clínicas, ambientais, alimentares ou geológicas, com elevado rigor e razoável precisão. Apesar de algumas limitações, a AAS é a técnica de análise elementar mais utilizada. Foi descoberta por Walsh, Alkemade e Melatz nos anos 50 do século XX. Consiste na excitação dos átomos em estado fundamental, presentes na amostra, através da incidência de uma luz num comprimento de onda específico. Os átomos absorvem essa luz, ocorrendo uma transição eletrónica para um

¹ Objeto ou substância padronizada que é usada como uma base para a medição de objetos similares

nível de energia mais elevado. Ao medir a quantidade de luz absorvida é possível determinar as concentrações dos elementos presentes na amostra (Bolann, Rahil-Khazen, Henriksen, Isrenn, & Ulvik, 2007; Harris, 2010).

Na espectrometria de absorção atômica existem, essencialmente, duas metodologias: espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) e espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS):

a) Espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS):

A FAAS é a técnica analítica mais simples e fácil para a análise de elementos. Utiliza uma chama para atomizar um composto em solução; normalmente, é uma chama de ar-acetileno ou com menos frequência, a chama mais quente de acetileno-óxido nitroso. A determinação de elementos individuais é rápida, no caso de múltiplos elementos a medição é morosa, mesmo no método automatizado. É relativamente barato, sendo considerado um método de eleição caso não se pretenda analisar mais do que dois ou três elementos diferentes em cada amostra. A principal limitação da FAAS é o facto de necessitar de um grande volume de amostra para a análise (vários mL), que devem estar numa forma aquosa, devido à incapacidade da FAAS em analisar diretamente amostras sólidas. É também de salientar que, no caso de a concentração do elementos a analisar estar no nível $\mu\text{g} / \text{L}$ ou inferior, a precisão é pobre e nesse caso outras técnicas deverão ser utilizadas (Bolann et al., 2007; Harris, 2010; Rouessac & Rouessac, 2013).

b) Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS)

Na GFAAS a atomização ocorre num tubo de grafite (forno), que é aquecido por uma corrente elétrica. Normalmente, é introduzida uma pequena quantidade de amostra (5-100 mL) no forno, sendo esta submetida a uma serie de passos num aquecimento cuidadosamente controlado, o que torna a GFAAS uma técnica muito mais lenta do que a FAAS. A sua principal vantagem resulta dos baixos limites de deteção, que são cerca de 10 a 100 vezes inferiores aos da FAAS. A GFAAS é o método de eleição para a determinação de elementos vestigiais e ultra-vestigiais, a um custo moderado. A GFAAS é particularmente favorável quando existem quantidades limitadas de amostra e quando apenas alguns elementos vestigiais são de interesse. Para além disso, em comparação com ICP-MS e ICP-AES, a GFAAS usa instrumentação mais simples e

com menor custo. Apesar de, convencionalmente a GFAAS estar associada á análise singular de elementos, hoje em dia já estão disponíveis no mercado máquinas capazes de analisar 4-6 elementos simultaneamente (Bolann et al., 2007; Harris, 2010; Rouessac & Rouessac, 2013).

Amostras

Praticamente qualquer amostra pode ser analisada, seja ela sólida, líquida ou gasosa. Antes da análise, a maioria das amostras é convertida em soluções homogêneas. As amostras sólidas devem ser dissolvidas ou digeridas. Produtos químicos ultrapuros são obrigatórios neste caso. As dissoluções podem variar desde alguns minutos a um máximo de 24 horas (Settle, 1997).

Limitações

- Não é obtida qualquer informação sobre os estados de oxidação dos átomos
 - A preparação da amostra é cansativa e demorada
 - Limitado a metais e metaloides
 - Técnica destrutiva
- (Settle, 1997)

II. Espectrometria de emissão atômica – com plasma acoplado (ICP-AES)

Na emissão atômica, uma amostra é submetida a um ambiente de alta energia térmica, a fim de produzir átomos num estado excitado, capazes de emitir luz. A fonte de energia pode ser um arco elétrico, uma chama, ou, mais recentemente um plasma. O espectro de emissão de um elemento exposto a uma tal fonte de energia é constituído por um conjunto de comprimentos de onda de emissão admissíveis (160 e 900 nm), normalmente denominados linhas de emissão e que permite a identificação e quantificação do elemento na amostra.

O plasma acoplado é uma mistura gasosa elétrica de árgon, iões de árgon e eletrões. O plasma é produzido a partir de um fluxo de árgon gasoso, ativado por uma fonte de energia que vai conduzir à elevada atomização e ionização do fluxo de árgon, gerando

uma temperatura de excitação de 7000-10,000 ° K. A temperatura elevada criada pelo plasma, faz com que a amostra sofra volatilização, atomização, excitação e ionização (Bolann et al., 2007; Harris, 2010; Rouessac & Rouessac, 2013).

Amostras

As amostras colocadas na máquina são maioritariamente líquidas; com amostras sólidas, devem ser implementados sistemas de dissolução e efetuar a análise como uma solução. As amostras sólidas orgânicas podem ser incineradas pelos diversos métodos existentes (*Dry Ashing*, *Wet Ashing* e *Low-temperature Ashing*). Após a preparação da amostra deve-se obter pelo menos 10-15mg de matéria inorgânica (Settle, 1997).

Limitações

- Não é obtida qualquer informação sobre os estados de oxidação dos átomos
- O elemento a ser determinado tem de ter uma ou mais linhas de emissão atômica na região dos 160 a 900 nm. Os elementos gasosos, halogéneos e carbono geralmente não são determinados
- Os solventes orgânicos voláteis podem extinguir o plasma, a menos que sejam utilizados métodos especiais de introdução de amostras
- Os componentes principais podem emitir linhas que se sobrepõem às dos componentes vestigiais, diminuindo os limites de deteção

III. Espectrometria de massa – com plasma acoplado (ICP-MS)

A técnica de espectrometria de massa (MS) foi descoberta por J.J Thomson no início do século XX e hoje em dia é uma das técnicas analíticas mais versáteis, encontrando aplicações em praticamente todas as vertentes da química (orgânica, inorgânica, física e analítica), bem como na biologia, medicina e ciência dos materiais. A técnica proporciona informação qualitativa e quantitativa sobre os materiais orgânicos e inorgânicos, incluindo a composição elementar, estrutura molecular e a composição de misturas. As propriedades que a tornam uma técnica analítica versátil e valiosa são a sua sensibilidade (recentemente, um limite de deteção de aproximadamente 500 moléculas) e a sua especificidade na deteção de compostos desconhecidos (Bolann et al., 2007; Harris, 2010; Rouessac & Rouessac, 2013).

Amostras

As amostras colocadas na máquina são maioritariamente líquidas; com amostras sólidas devem ser implementados sistemas de dissolução e efetuar a análise como uma solução. As amostras sólidas orgânicas podem ser incineradas pelos diversos métodos existentes (*Dry Ashing*, *Wet Ashing* e *Low-temperature Ashing*). Após a preparação da amostra deve-se obter pelo menos 10-15mg de matéria inorgânica.

As amostras orgânicas apresentam maiores complicações nesta técnica do que na ICP-AES, uma vez que as amostras têm de atravessar um pequeno orifício, entre um ambiente de elevada temperatura e outro de vácuo. Este orifício pode facilmente ficar bloqueado, caso seja introduzida uma quantidade substancial de matéria orgânica.

(Settle, 1997)

Limitações

- Os efeitos da matriz são mais comuns e graves neste tipo de análise do que na ICP-AES
- Soluções com altas concentrações de partículas sólidas podem obstruir o orifício.
- Soluções orgânicas requerem a adição de oxigénio ao plasma ou o pré-tratamento da amostra, para evitar a obstrução do orifício com carbono elementar
- Interferências poliatómicas resultantes de solventes e do árgon causam diminuição dos limites de deteção
- O tempo, esforço, manutenção e custo inicial da máquina são mais elevados do que na ICP-AES
- São necessários reagentes com elevado grau de pureza, bem como um cuidado extremo para evitar a contaminação e otimizar a sensibilidade e precisão da técnica
- Não é obtida qualquer informação sobre os estados de oxidação dos elementos
- Os elementos analisados devem ter um potencial de ionização menor que o do árgon (15.8eV)

(Settle, 1997)

IV. Fluorescência de raios-X (XRF)

Em 1909 Charles G. Barkla encontra uma conexão entre a irradiação com raios-X de uma amostra e o peso atômico dos seus elementos. Porém, só em 1913, Moseley encontrou a relação possível entre o espectro obtido e o elemento em causa. Pode concluir que a frequência da risca obtida tinha a haver, não com o peso atômico do elemento, mas sim com o seu número atômico (Z).

Na década de 50 do século XX surgem os primeiros aparelhos comerciais de análise elementar baseados na técnica de XRF (Beckhoff, Kanngießer, Langhoff, Wedell, & Wolff, 2006; Shackley, 2011).

A XRF é um método de espectrometria atômica com base na detecção de radiação de raios X emitida a partir de átomos excitados. Esta técnica consiste num processo de duas etapas, que começa com a excitação de elétrons da camada interna e sua remoção, sendo depois a vaga resultante preenchida por um elétron de uma camada exterior. A transição é acompanhada pela emissão de um fóton de raios x. O fóton fluorescente² é característico do elemento, sendo possível identifica-lo através da medição da energia emitida. A intensidade dos fótons emitidos permite determinar a concentração do elemento (Beckhoff et al., 2006; Rouessac & Rouessac, 2013; Settle, 1997).

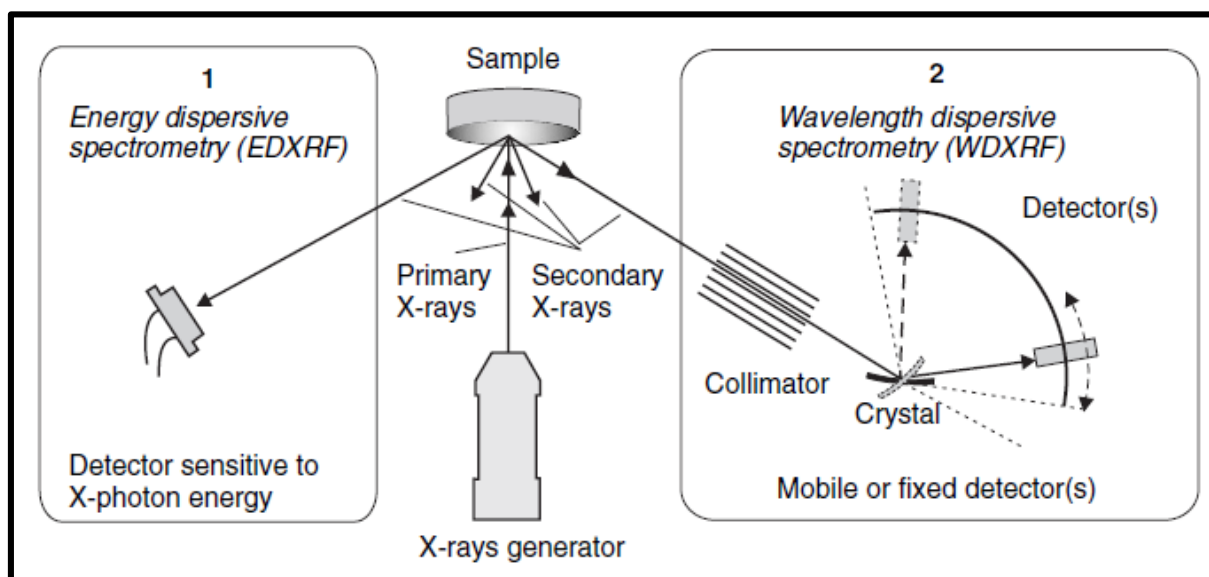


Figura 20 - Esquema das duas técnicas mais comuns de XRF (EDXRF e WDXRF)

² Fluorescência é o termo aplicado a fenômenos em que a absorção de radiação numa energia específica resulta na reemissão da radiação de uma energia diferente (em geral menor)

Aplicações comuns

- Permite a identificação qualitativa e a determinação quantitativa das composições elementares de uma variedade de amostras sólidas e líquidas.
- A baixa necessidade de preparação da amostra, a ampla faixa de análise elementar e o facto de ser uma metodologia não destrutiva fazem da XRF um método analítico de eleição para muitas indústrias
- Determinação da quantidade de enxofre no combustível diesel para atender às regulamentações ambientais.
- Controlo das concentrações de aditivos em óleos lubrificantes
- Controlo dos processos de produção do aço e cimento
- Identificação de contaminação superficial na produção de semicondutores
- Seleção de ligas metálicas
- Aplicações forenses na avaliação de provas
- Aplicações biológicas em tecidos animais, *post-mortem* e *in vivo* (Settle, 1997)

Amostras

- Qualquer amostra, sólida ou líquida pode ser analisada; a quantidade necessária varia entre os mg e os g, dependendo da metodologia utilizada. O nível de preparação da amostra é determinado pelas necessidades analíticas, tais como o nível de exatidão e precisão exigidas pelo estudo em causa. Para uma análise simples, que, no entanto permite obter resultados qualitativos e semi-quantitativos não é necessária qualquer preparação, podendo a amostra ser analisada tal como foi recebida. Para resultados semi-quantitativos e quantitativos é necessária uma preparação mínima, que passa por triturar, homogeneizar e prensar a amostra em pastilhas. Para um pré-tratamento máximo, é recomendável secar e fundir a amostra em discos de vidro; este método fornece os resultados quantitativos com maior exatidão e precisão. (Beckhoff et al., 2006; Rouessac & Rouessac, 2013; Settle, 1997)

Limitações

- A faixa elementar está limitada aos elementos boro e de número atômico superior.
 - Interferência da matriz pode impedir ou limitar a detecção de alguns elementos
 - *Reference standards* na análise quantitativa nem sempre coincidem com matrizes desconhecidas
- (Settle, 1997; Shackley, 2011)

2.3 FUNDAMENTOS DA XRF

Níveis de energia e linhas características de raios-X

A emissão de raio-X característicos da amostra depende da natureza dos elementos existentes nessa amostra. Estes raios-X característicos são produzidos quando um elétron de um nível mais interno do átomo é expelido, deixando vago o seu lugar, este mecanismo é desencadeado pelo bombardeamento da amostra com um feixe de raio-X. Durante o processo de rearranjo do átomo em que os elétrons decaem das camadas mais externas para as mais internas ocorre emissão de raio-X (fotões) característicos do elemento. O átomo é então reconduzido ao seu estado fundamental.

Se a transição se opera para um nível $n=1$, a risca obtida no espectro descontínuo (espectro de riscas), designa-se por K, para o nível $n=2$, por L, etc... Normalmente, a análise por espectrometria de raio-X é feita com base em riscas K e L.

A risca mais intensas numa dada série é designada por α , seguida de β , γ , δ , etc...

Devido à divisão da camada L em três subcamadas, o espectro L é mais complexo do que o espectro de K, contendo pelo menos 12 linhas (Beckhoff et al., 2006; Rouessac & Rouessac, 2013; Settle, 1997; Shackley, 2011).

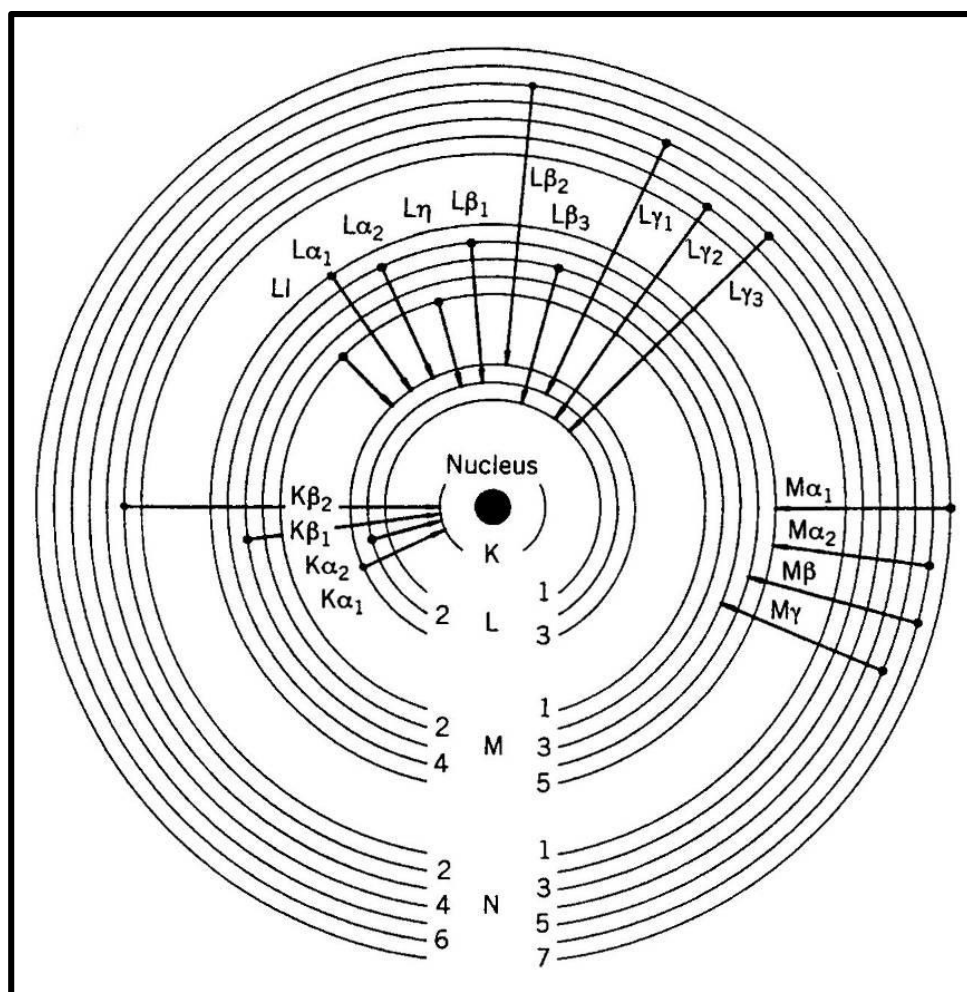


Figura 21 - Transições possíveis dos elétrons (Beckhoff et al., 2006)

Tipos:

A maioria dos instrumentos de XRF divide-se em duas categorias, os de dispersão de energia (EDXRF) e os de dispersão em comprimento de onda (WDXRF).. Dentro destas duas categorias existem variadíssimas configurações, fontes de raios-X e tecnologias de detecção, sendo aqui abordados os instrumentos mais comuns.

Os instrumentos WDXRF (figura 22) operam com base no princípio da difração de Bragg de um feixe de raios X colimado. Nos instrumentos de EDXRF todo o espectro emitido pela amostra incide num detetor, capaz de registrar a energia de cada fóton que o atinge (Beckhoff et al., 2006; Rouessac & Rouessac, 2013; Settle, 1997; Shackley, 2011).

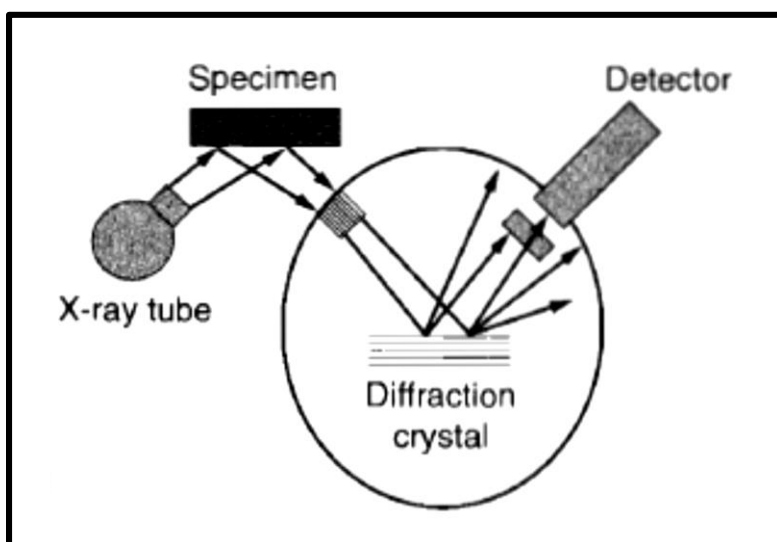


Figura 22 - Esquema do funcionamento básico de um WDXRF (Settle, 1997)

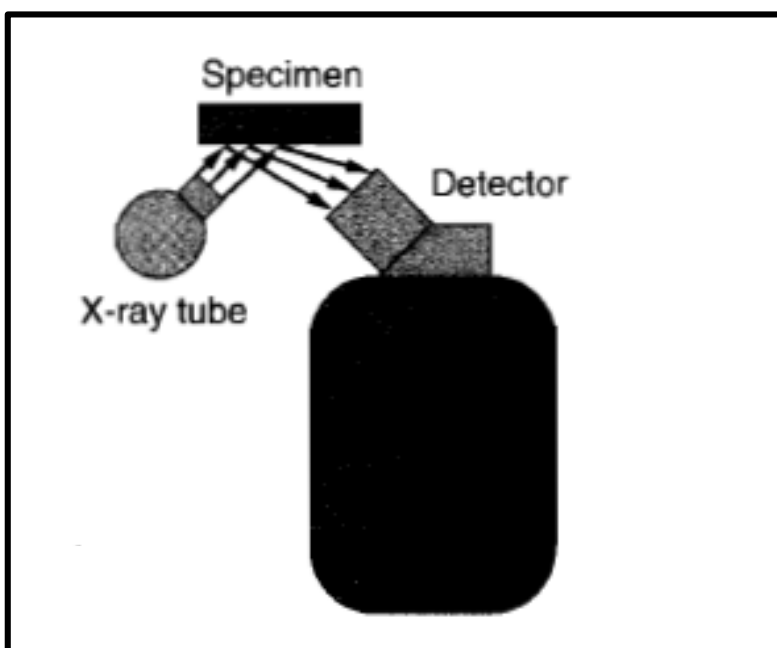


Figura 23 - Esquema do funcionamento básico de um EDXRF (Settle, 1997)

Fontes de Raio-X

A fonte de raios-X consiste numa ampola de vácuo, com dois eletrodos, um cátodo e um ânodo. O cátodo é formado por um fio metálico (normalmente tungsténio) enrolado em hélice e coberto por uma peça metálica que direciona o feixe eletrónico. O ânodo é composto por uma barra metálica, normalmente de cobre, recoberto por molibdénio ou tungsténio. Para a produção de raios-X na ampola, o filamento do cátodo é aquecido através de corrente elétrica, estabelecendo uma elevada diferença de potencial entre os dois eletrodos. Os eletrões emitidos pelo cátodo são acelerados e colidem com o ânodo, gerando radiação de travagem (espectro contínuo), bem como linhas de raios X características do material do ânodo (espectro descontínuo). Estes fótons escapam através de uma janela de berílio existente no lado da ampola.

A potência dos raios-X pode ser configurada em diferentes níveis, desde uma fração de um watt para instrumentos de EDXRF até vários kilowatts para WDXRF, podendo ser necessário empregar sistemas de arrefecimento da ampola, dado que a maioria da energia é dissipada na forma de calor (Beckhoff et al., 2006; Rouessac & Rouessac, 2013).

Para a deteção de elementos leves, deve estar disponível uma radiação de baixa energia, ou seja, 1-10 keV, enquanto que para elementos pesados é necessário uma excitação com energias elevadas até 50 keV (Beckhoff et al., 2006; Shackley, 2011).

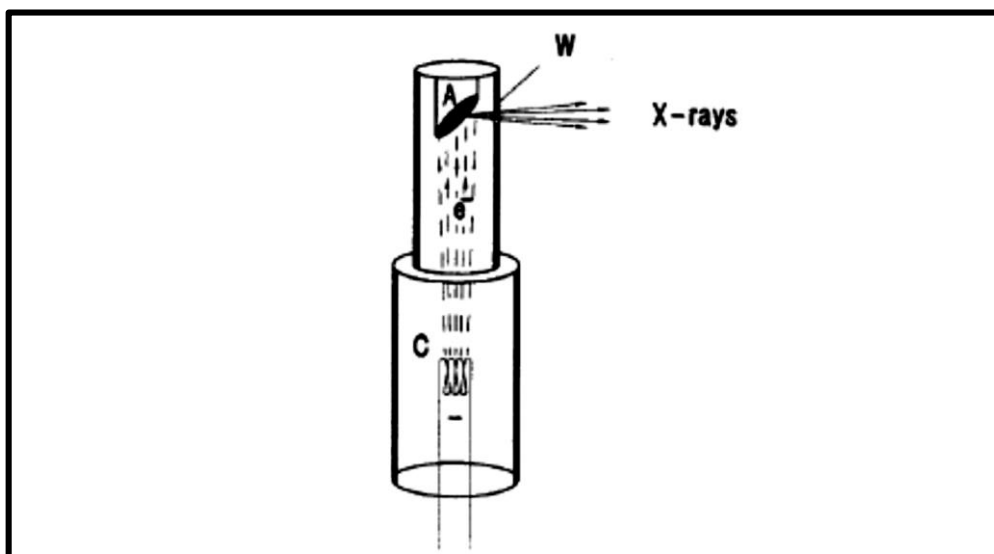


Figura 24 - Tubo de raio-X; A - ânodo, C - cátodo, W – janela (Beckhoff et al., 2006)

Detetores

Os dois sistemas de espectrometria (WD e ED) diferem de forma categórica nos seus sistemas de detecção da energia emitida pelos elementos excitados da amostra (Shackley, 2011). O EDXRF utiliza cristais semicondutores que recebem a totalidade do espectro emitido pela amostra e, através de um processo de ionização, convertem os raios-x característicos, em impulsos elétricos proporcionais. O material mais utilizado na formação destes cristais de detecção é o silício (Si), com lítio (Li), para compensar pequenos níveis de impureza. Cristais de germânio de elevada pureza (HPGe) também podem ser utilizados; no entanto Si (Li) foi o primeiro material usado nos detetores de EDXRF e continua a ser, hoje em dia, a escolha mais comum (Beckhoff et al., 2006; Shackley, 2011). Na técnica de WDXRF os raios-X gerados pela amostra são selecionados, utilizando um ou vários cristais de análise com um espaçamento de rede específico. A radiação emitida por um determinado elemento incide nos cristais de análise num ângulo específico (Θ) e segundo a lei de Bragg³, essa mesma radiação reflete-se no cristal com o mesmo ângulo Θ ; apenas os raios-X que satisfazem a lei de Bragg são refletidos e, portanto um único comprimento de onda passa para o detetor.

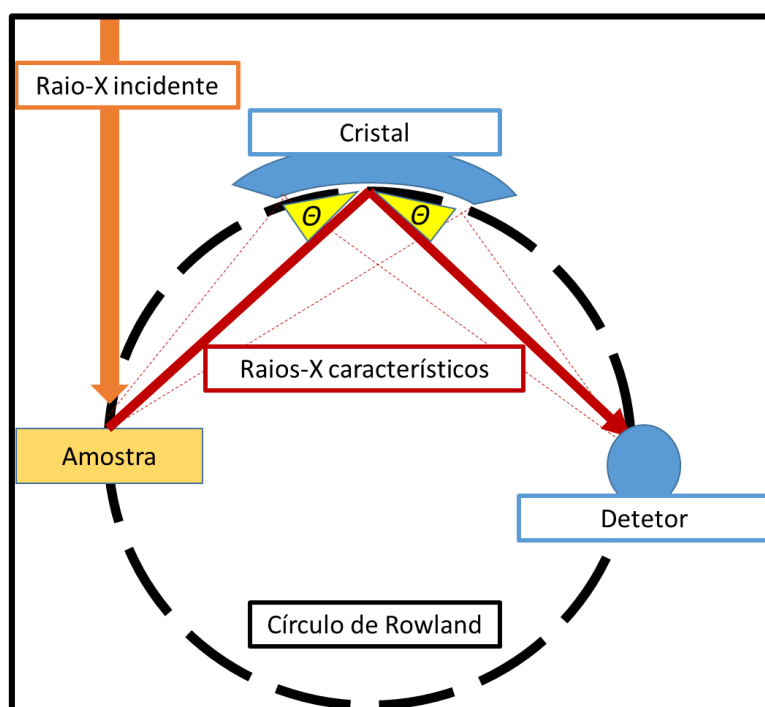


Figura 25- Relação entre amostra, cristal de análise e detector no círculo de Rowland (adaptado de Beckhoff et al; 2006)

³ Lei de Bragg: $n\lambda = 2d \sin\Theta$; onde n= número inteiro referindo-se a ordem do reflexo; λ = comprimento de onda do raio X característico; d= espaçamento de rede do material de difração; Θ = ângulo entre o raio-X e o cristal de análise

Para manter uma relação geométrica correta entre amostra, cristal de análise e detetor em toda a gama de ângulos difratados, é necessário manter todos os três componentes no círculo de Rowland (figura 25). Isto é conseguido por um goniómetro mecânico que movimenta o cristal e o detetor de modo a que se mantenham as condições de difração corretas (Beckhoff et al., 2006; Shackley, 2011).

Os detetores utilizados nos espectrómetros de WDXRF são geralmente contadores, que consistem em câmaras de ionização com uma substância (normalmente um gás), que se ioniza quando partículas carregadas a atravessam. Estes iões são atraídos por um campo elétrico, existente entre o cátodo e o ânodo do contador. O número total de cargas obtido, resultante da ionização, origina um impulso proporcional à energia da radiação incidente (Beckhoff et al., 2006; Shackley, 2011).

EDXRF

Vantagens

- O utilizador pode adquirir um espectro elementar completo em apenas alguns segundos. Os *softwares* disponíveis hoje em dia permitem identificar facilmente os picos elementares, tornando a EDXRF uma ferramenta útil na investigação com amostras de constituição desconhecida, antes de uma análise quantitativa.
- EDXRF permite efetuar estudos semi-quantitativos para determinar a composição química (Beckhoff et al., 2006; Shackley, 2011)

Desvantagens

- Costumam ocorrer sobreposições de picos de energia, em particular entre níveis de energia diferentes (K,L e M) de elementos diferentes (Ex. existem sobreposições próximas entre o manganês-K α e o cromo-K β , ou o titânio-K α e várias linhas L do bário). O utilizador, necessita então de aplicar métodos para obter a separação dos picos, ou dado o contexto da amostra decidir qual é o elemento que faz mais sentido.

- A EDXRF é pouco utilizada para a análise química, contudo, a resolução dos detetores tem evoluído e portanto este método tornar-se-á numa alternativa fiável e precisa ao da WDXRF
- Os instrumentos de EDXRF equipados com detetores de berilo, não conseguem detetar os elementos de número atómico inferior ao do sódio ($Z=11$)
- As múltiplas massas de um elemento (isótopos), não podem ser determinadas pela EDXRF (Beckhoff et al., 2006)

WDXRF

Vantagens

- A WDXRF é utilizada para análises quantitativas não destrutivas de amostras tão pequenas quanto alguns micrómetros, com níveis de deteção baixos, para elementos de número atómico igual ao boro ($Z=5$) ou superiores.
- A WDXRF funciona com uma variedade de materiais sólidos, naturais ou sintéticos, incluindo minerais, vidros, esmalte dos dentes, semicondutores, cerâmicas, metais, etc...
- Os espectómetros WDXRF permitem mapear os elementos na amostra
- Quando comparado com a EDXRF, a WDXRF apresenta uma resolução superior e maior sensibilidade para os elementos vestigiais (Beckhoff et al., 2006; Shackley, 2011)

Desvantagens

- Com a WDXRF não é possível detetar elementos com número atómico abaixo de 5 (boro), impossibilitando a deteção de vários elementos importantes (Ex. Hidrogénio, Lítio, e Berílio).
- Alguns picos apresentam sobreposições significativas (Ex. Vanádio- $K\alpha$ e Titânio- $K\beta$)
- As Análises por WDXRF, tais como as de EDXRF, não permitem distinguir entre os estados de valência dos elementos (por exemplo, Fe^{2+} vs Fe^{3+}), sendo necessárias outras técnicas para obter esse tipo de informação.

- As múltiplas massas de um elemento (isótopos), não podem ser determinadas pela WDXRF
(Beckhoff et al., 2006)

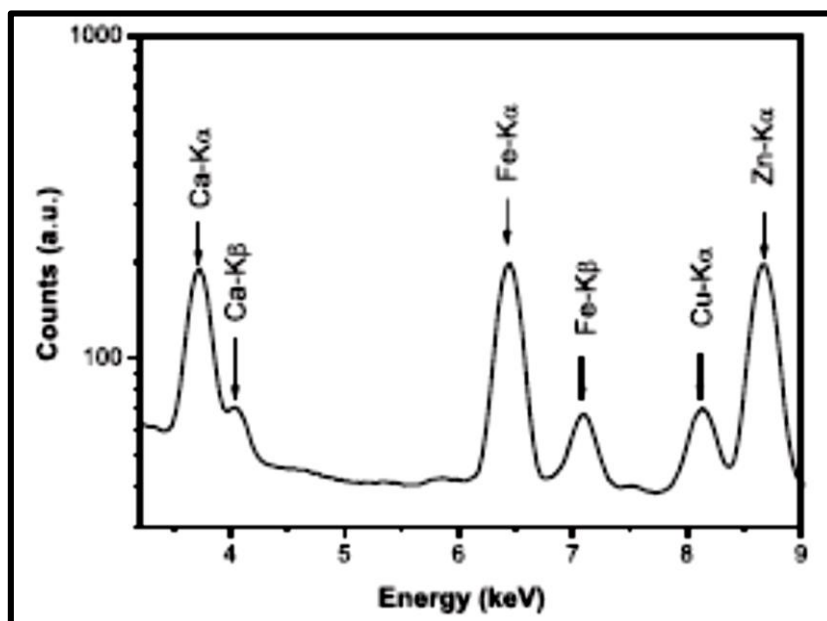


Figura 26 - Típico espectro EDXRF do cancro da mama (Marina Silva et al., 2012)

Comparação da XRF com outras técnicas analíticas

XRF é uma técnica versátil e rápida que possibilita a análise de uma grande variedade de amostras, desde pós a líquidos. É uma técnica útil e económica, em que o maior custo é o próprio *hardware*. Os instrumentos apresentam poucas partes móveis, necessitando de reduzida manutenção e no seu uso convencional consomem apenas nitrogénio líquido (nos aparelhos que necessitam de arrefecimento) e eletricidade.

A principal desvantagem das técnicas de XRF consiste nos elevados limites de deteção, quando comparados com outros métodos. Os limites de deteção na espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) são bastante mais reduzidos que na XRF, no entanto estas análises podem apresentar interferências da matriz. A GFAAS é um método relativamente lento porque os elementos são analisados, um de cada vez, e é também uma técnica destrutiva.

ICP-MS é uma técnica versátil, que pode atingir limites de deteção inferiores aos da XRF. Em termos de velocidade de análise, a ICP-MS é tão ou mais rápida que as técnicas de XRF, apresentando níveis de precisão muito elevados. No entanto as

amostras devem estar num estado líquido, o que muitas vezes exige digestão ácida e uma preparação trabalhosa das amostras. As técnicas de ICP exigem grandes quantidades de argon puro em estado gasoso, tornando-as extremamente dispendiosas (Beckhoff et al., 2006; Harris, 2010; Shackley, 2011).

Parâmetros	FAAS	GFAAS	ICP-AES	ICP-MS	WDXRF
Tempo de análise	Rápido	Lento	Rápido	Rápido	Rápido
Custo	Baixo	Moderado	Elevado	Muito Elevado	Elevado
Facilidade de utilização	Fácil utilização	Requer alguma experiência	Requer alguma experiência	Requer alguma experiência	Fácil utilização

Tabela 2 - Comparação de técnicas analíticas (adaptado de Bolann et al., 2007)

2.4 APLICAÇÕES DAS TÉCNICAS ANALÍTICAS NO CANCRO:

Nos últimos anos várias investigações foram realizadas relativamente aos níveis de elementos vestigiais em tecidos carcinomatosos e não carcinomatosos nos humanos, utilizando diferentes técnicas analíticas, tais como a espectrometria de absorção atômica (AAS) e diversas variantes da XRF (PIXE, SR-XRF, TXRF). Estes estudos dão conta que as concentrações de alguns elementos vestigiais aumentam nos tecidos neoplásicos; no entanto, os resultados variam consideravelmente de autor para autor, sugerindo que os mesmos são fortemente influenciados pela técnica de medição aplicada e pelos processos experimentais a que as amostras são sujeitas (Boman, Magalhães, Carvalho, Von Bohlen, & Becker, 2010; Mulware, 2013; Mariana Silva et al., 2009; Marina Silva et al., 2012).

Devido ao seu importante papel no metabolismo dos elementos vestigiais metálicos, o fígado, o pulmão e o rim são os órgãos mais frequentemente estudados. Recentemente,

outros órgãos, como a mama, a próstata, o pénis, a tiróide e o estômago têm vindo a captar o interesse dos investigadores. A grande maioria dos estudos utiliza amostras dos tecidos carcinomatosos, comparando posteriormente os resultados das concentrações dos elementos vestigiais com os obtidos em amostras de tecido saudável; em alguns estudos, foi utilizado outro tipo de amostras, como urina nos casos de cancro renal ou da bexiga, soro sanguíneo (plasma sanguíneo sem fibrinogénio) e cabelos.

2.4.1 Cancro da mama

O tecido neoplásico da mama é o tipo de cancro mais estudado em termos de concentrações de elementos vestigiais. Vários estudos, utilizando diferentes técnicas analíticas, comprovam que certos elementos, nomeadamente Ca, Fe, Cu, Zn e Se apresentam concentrações significativamente mais elevadas em tecidos neoplásicos da mama, do que em amostras de tecido saudável (Mulware, 2013; Mariana Silva et al., 2009; Marina Silva et al., 2012). Num artigo de revisão, S. Mulware (2013) afirma que certos elementos vestigiais apresentam, de um modo geral, concentrações semelhantes, quer em tecido neoplásico, quer em tecido saudável; é o caso do K, Ti e Ni. Para além das investigações que utilizam amostras de tecido carcinomatoso, existem diversos estudos que aplicam as técnicas analíticas de deteção de elementos vestigiais em amostras de soro sanguíneo. No estudo realizado por, Sarita et al.(2011), foi observada uma redução significativa nas concentrações dos elementos Ti, Cr, Mn, Ni, Zn e Se, demonstrando juntamente com outros estudos, que existe uma correlação entre o aumento dos níveis de certos elementos vestigiais em tecidos neoplásicos e a sua diminuição no soro sanguíneo.

Vários estudos sugerem que a relação dos níveis séricos de Cu e Zn (Cu/Zn) é um melhor indicador de diagnóstico e prognóstico do que as concentrações individuais destes elementos (Mulware, 2013).

Embora o papel dos elementos vestigiais ainda não esteja completamente bem estabelecido na literatura, o aumento das suas concentrações nos tecidos neoplásicos da mama parece estar relacionado com aspetos metabólicos e estruturais, conferindo a estes elementos um elevado potencial como biomarcadores de diagnóstico e de prognóstico. No estudo de Marina P Silva et al. (2012) os pacientes com concentrações mais elevadas de Cu apresentaram piores taxas de sobrevivência, comprovando o que vários estudos afirmam - o cobre tem um papel crucial no mecanismo da angiogénese, com

elevação do potencial metastático do tumor sendo por conseguinte, uma das principais causas de mortalidade em pacientes com cancro da mama.

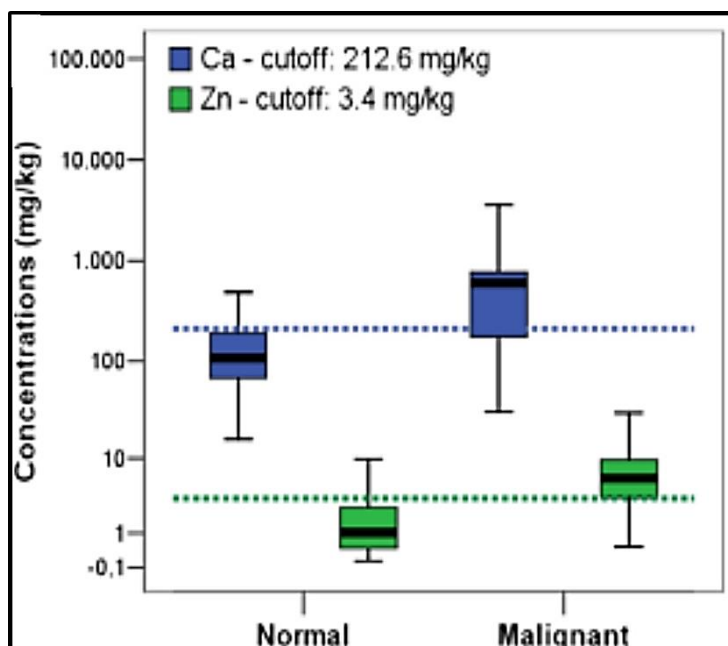


Figura 27 - Gráfico das concentrações dos elementos vestigiais Fe e Zn em tecidos da mama saudável e neoplásico (Marina Silva et al., 2012)

2.4.2 Cancro do cólon

Vários estudos demonstram haver nas células cancerígenas maiores concentrações de Cu e Fe do que nas células de tecidos saudáveis (Carvalho, Magalhães, Becker, & Bohlen, 2007). Num estudo realizado por Benninghoff, von Czarnowski, Denkhaus, & Lemke (1997), só os elementos P, S, K, Ti, Se e Rb mostram uma tendência de acumulação no tecido neoplásico; destes, os elementos P, K, Se e Rb mostram uma maior tendência para a acumulação em tecidos malignos, enquanto o S mostra uma maior tendência para a acumulação nos tecidos benignos. Magalhães & Bohlen, (2006) descobriram, utilizando técnicas analíticas de XRF, que os níveis de Ca, Zn e Sr eram semelhantes nos tecidos saudáveis e nos tecidos carcinomatosos, e que os elementos P, K, Ni e Cu mostram uma tendência para o aumento no tecido carcinomatoso. Br e I foram os únicos elementos cujas concentrações diminuíram no tecido carcinomatoso. Noutro estudo conduzido pelo mesmo grupo, concluiu-se existir um aumento significativo dos níveis de Se nos tecidos saudáveis, podendo este fenómeno estar ligado ao facto do Se ser um antioxidante e, por conseguinte, ajudar a neutralizar os radicais livres (Boman et al., 2010).

2.4.3 Cancro do estômago

O aumento do número de casos de cancro do estômago, chamou a atenção dos investigadores para o estudo deste tipo de cancro. Na investigação realizada por Reddy et al (2003) utilizando uma variante da técnica de XRF (PIXE), foram detetados aumentos de concentrações dos elementos Cr, Ni, As, e Br e reduções nos níveis dos elementos Cl, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Co, Cu, e Zn em tecidos carcinomatosos em relação a tecidos saudáveis. Num trabalho mais recente, realizado por Boman et al. (2010) os elementos P, K, Fe e Rb apresentaram concentrações mais elevadas, de acordo com as afirmações de Benninghoff & Denkhau (1998) que relataram haver um aumento dos elementos P, S, K, Se e Rb. A discrepância dos resultados apresentados pelos diferentes autores é um indicador de que é muito importante efetuar mais investigação nesta área do cancro do estômago, a fim de estabelecer um consenso sobre quais são os elementos vestigiais com maior potencial para biomarcadores.

2.4.4 Cancro da cavidade oral

Existem poucos estudos que investiguem as concentrações dos elementos vestigiais em tecidos carcinomatosos da cavidade oral. A grande maioria dos estudos utiliza amostras de saliva ou soro sanguíneo e está, normalmente, mais focada nas lesões pré-malignas, principalmente na fibrose submucosa. Estes estudos são predominantemente realizados por grupos asiáticos em populações asiáticas, onde o consumo da noz de areca é extremamente elevado. Esse facto tem impedido que se transponham os resultados obtidos para a realidade da população Europeia ou Portuguesa., cujos fatores etiológicos são substancialmente diferentes.

A noz de areca apresenta uma elevada quantidade de Cu na sua constituição e é considerada um dos fatores etiológicos principais da fibrose submucosa. Num estudo recente, realizado por Khanna et al. (2013), foram comparadas as concentrações dos elementos Cu, Zn, Se e Mo no soro sanguíneo de pacientes diagnosticados com cancro das células escamosas e fibrose submucosa com as de um grupo de controlo saudável. Os níveis séricos de Cu nos grupos da lesão pré-maligna e do cancro oral foram mais elevados quando comparados com os do grupo de controlo; o aumento de Cu no soro pode dever-se aos elevados níveis de Cu presentes na noz de areca. A relação Cu/Zn foi também estudada, devido ao seu enorme potencial como biomarcador de diagnóstico e prognóstico noutros tipos de cancro (ex. cancro da mama). No entanto, neste estudo não se obteve significância estatística para comprovar a utilidade da relação Cu/Zn no

cancro oral. As concentrações de Se e Mo no grupo de controlo foram mais elevadas do que nos grupos de fibrose submucosa e de cancro oral, confirmando o importante papel destes dois elementos na prevenção das lesões cancerígenas.

Num estudo muito semelhante ao anterior, Shetty et al. (2013) confirmam o aumento da concentração do Cu e uma diminuição do Zn sérico nos pacientes diagnosticados com lesões pré-malignas e malignas. Confirmando a teoria de Nayak (2010) de que as células cancerígenas têm importadores desregulados de Zn, provocando o aumento dos níveis de Zn no tecido carcinomatoso. A relação Cu/Zn foi também avaliada, revelando um valor mais elevado nos grupos estudados (fibrose submucosa, leucoplasia e cancro oral), apresentando-se portanto como um possível biomarcador para o cancro oral.

Ayinampudi & Narsimhan (2012) utilizando a técnica de ICP-MS analisaram amostras de saliva de pacientes diagnosticados com PMD e cancro oral, comparando-as com as de um grupo de controlo saudável. Os resultados obtidos por aquele grupo revelaram um aumento dos níveis salivares de Cu e Zn; este aumento é mais evidente no grupo do cancro oral do que no dos PMD. Dentro do grupo dos PMD o subgrupo de fibrose submucosa apresenta um aumento significativo de Cu quando comparado com os outros PMD (leucoplasia, líquen plano) que apresentam entre si valores semelhantes de Cu.

2.5 PROJETO DE INVESTIGAÇÃO

Objetivo:

Comprovar a alteração das concentrações de certos elementos vestigiais em tecidos carcinomatosos da cavidade oral relativamente a tecidos saudáveis e portanto puder usar esses elementos como biomarcadores.

Resumo:

Vários estudos comprovam uma maior concentração de elementos vestigiais em tecidos neoplásicos (benignos ou malignos) do que em tecidos saudáveis. No entanto, em tecidos carcinomatosos da cavidade oral, ainda não há nenhum estudo que comprove este aumento de concentração.

Para a determinação das concentrações desses elementos utilizar-se-ia uma técnica de fluorescência de raio-X por dispersão em comprimento de onda (WDXRF – Wavelength Dispersive X-ray Fluorescence), que permite quantificar, a um nível atômico, o conteúdo da amostra sem a danificar.

Uma vez que o ISCSEM possui uma máquina de WDXRF, será possível aproveitando a colaboração do Instituto Português de oncologia (IPO), avançar na determinação da presença de elementos vestigiais em maiores concentrações em amostras de tecido neoplásico da cavidade oral.

Materiais e métodos:

a) Recolha das amostras:

- As amostras de tecidos neoplásicos da cavidade oral serão colhidas nas cirurgias de cabeça e pescoço no IPO
- Utilizar-se-ão os *left overs*, ou seja o material que sobra após a análise histopatológica
- Os tecidos serão conservados em formol 10%, para evitar autólise que se inicia após a morte dos tecidos e a própria digestão do material por bactérias decompositoras.



Figura 28 - Amostra de carcinoma da língua

- O ideal seria obter amostras de tecido neoplásico fresco, sem conservação em materiais fixadores, de forma a evitar contaminações com substâncias extrínsecas; no entanto devido ao protocolo laboratorial existente no IPO será muito complicado contornar esta situação.

- Para minimizar o erro de contaminação através do formol, poder-se-á aplicar um protocolo de correção dos espectros, analisando-se a constituição elementar do formol utilizado

b) Preparação das amostras:

- Não é necessário qualquer tipo de tratamento químico prévio
- Cada amostra de tecido é liofilizada durante 24h, a -50°C e a 1 atm,



Figura 29 – liofilizador

- Reduz-se a amostra, através de um processo de moagem, a pó

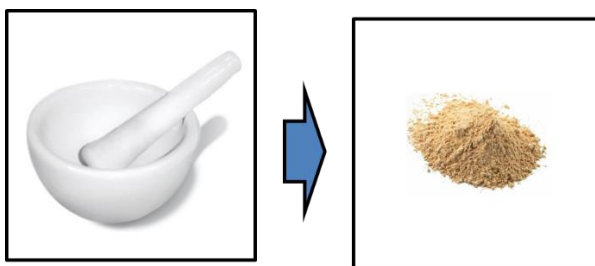


Figura 30 – Moagem

- Comprime-se o pó em pastilhas de 2 cm de diâmetro utilizando a prensa SPECAC, obtendo-se um disco com diâmetro de 2 cm

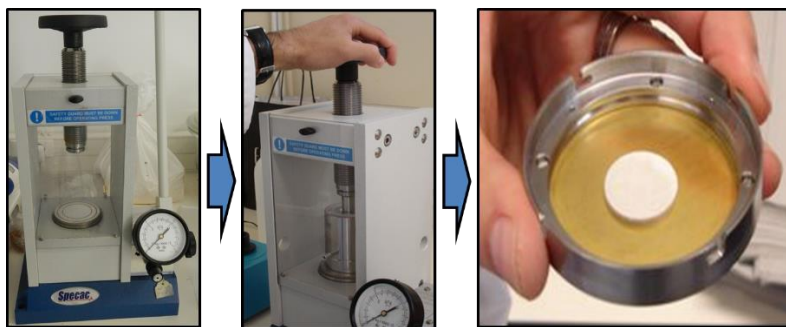


Figura 31 - Compressão do pó em pastilha

c) Análise das amostras na máquina de WDXRF:

- As amostras são colocadas na máquina de WDXRF (Modelo S4 PIONEER da marca Bruker), dentro do tabuleiro de análise

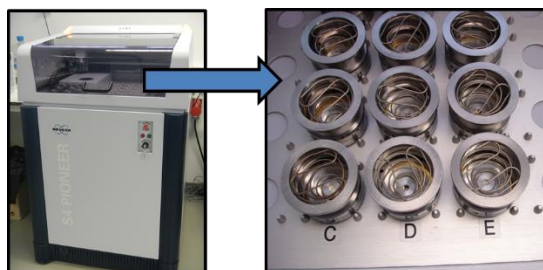


Figura 32 - Análise da amostra na máquina de WDXRF

- Através de um programa controlado por computador a máquina faz a recolha da amostra, colocando-a depois na câmara de análise, onde vai ser bombardeada pelo feixe de raio-X

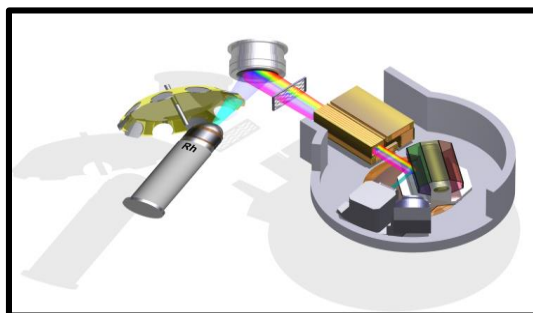


Figura 33 - Esquema de funcionamento da máquina

- Os raios-X característicos emitidos pela amostra são captados pelos detetores, que por sua vez transmitem a informação a um computador que processa os dados, apresentando um gráfico com as concentrações elementares da amostra.

Relevância clínica:

- Possibilidade de utilizar a máquina de WDXRF como forma de detetar variações de concentrações de elementos vestigiais em tecidos carcinomatosos orais
- Possibilidade de descobrir novos biomarcadores de diagnóstico e prognóstico para o cancro da cavidade oral
- Expandir o conhecimento sobre os elementos vestigiais em tecido neoplásico da cavidade oral

Limitações:

Volume da amostra

- Para a análise na máquina de WDXRF é necessário 1cm³ de tecido
- Nem todos os tumores da cavidade oral apresentam este tipo de volume e atendendo a que a quantidade de tecido residual, após a análise histopatológica é reduzida, certamente o tempo de colheita terá de ser extenso.

Contaminação extrínseca

- Os tecidos colhidos no IPO são conservados em formol 10% e por vezes em parafina, podendo gerar contaminações

3 CONCLUSÃO

Como já se referiu, esta revisão bibliográfica foi prevista inicialmente como um trabalho de investigação. Não foi possível, porém, em termos de tese de mestrado, avançar com a investigação, devido a algumas limitações, a destacar a dificuldade que cedo se deparou na aquisição das amostras com o fim em vista.

Esta monografia parece, contudo, ser de interesse na aquisição de conhecimentos básicos e essenciais para o desenvolvimento do projeto de investigação que, aliás, já está em curso. Eis algumas das principais conclusões:

- Na vertente de cancro oral concluiu-se que o diagnóstico precoce continua a ser a melhor forma de prevenção contra a morbilidade e mortalidade e que, apesar dos avanços em termos de novos métodos de diagnóstico, ainda não existe um que seja infalível. A investigação de novas técnicas de deteção e diagnóstico de lesões pré-malignas e malignas é bem fundamental na luta contra o cancro.
- Dentro da vertente do cancro oral, os biomarcadores que permitem a implementação de terapêuticas personalizadas para cada tipo de lesão, evitando tratamentos desnecessários que podem deteriorar a qualidade de vida do paciente. No cancro oral existem poucos estudos relativamente a biomarcadores, daí ser essencial para melhorar as terapêuticas intensificar a investigação nesta área.
- Relativamente às técnicas analíticas, apesar das desvantagens associadas à WDXRF quando comparada com outras técnicas, continua contudo, a ser um método de custo moderado com elevada sensibilidade, e perfeitamente indicado para a deteção dos elementos vestigiais em amostras de tecido neoplásico. O facto de existir uma máquina de WDXRF nas instalações do ISCSEM permite avançar com o projeto de investigação, tal como anteriormente já se referiu.
- Vários estudos já comprovaram, através de diferentes técnicas analíticas e em diferentes tipos de tecidos, que existem certos elementos, tais como o Cu, Fe e o Zn, em concentrações alteradas nos tecidos neoplásicos. Com base neste pressuposto, deduz-se que nos cancros da cavidade oral, devam surgir também alterações de certos elementos, que deste modo, podem vir a ser utilizados como biomarcadores de diagnóstico e de prognóstico. Também esta uma razão de peso para se avançar com o referido projeto.

A presente monografia visa, em resumo servir como base de referência ao projeto de investigação, uma vez que se trata de uma compilação de conhecimentos interligados com o projeto em causa. Tendo em vista tal facto deixou-se no último capítulo o protocolo de preparação das amostras, bem como as principais limitações que se vão encontrar na realização da investigação futura.

4 **BIBLIOGRAFIA**

- Avon, S.-L., & Klieb, H. B. E. (2012). Oral soft-tissue biopsy: an overview. *Journal (Canadian Dental Association)*, 78, c75. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22889502>
- Ayinampudi, B. K., & Narsimhan, M. (2012). Salivary copper and zinc levels in oral pre-malignant and malignant lesions. *Journal of oral and maxillofacial pathology JOMFP*, 16(2), 178–82. doi:10.4103/0973-029X.98452
- Bagan, J., Sarrion, G., & Jimenez, Y. (2010). Oral cancer : Clinical features. *Oral Oncology*, 46(6), 414–417. doi:10.1016/j.oraloncology.2010.03.009
- Beckhoff, B., Kanngießer, habil. B., Langhoff, N., Wedell, R., & Wolff, H. (Eds). (2006). *Handbook of Practical X-Ray Fluorescence Analysis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-540-36722-2
- Benninghoff, L., & Denkhaus, E. (1998). Trace element distribution in human tissues of the digestive tract for malignant-normal and tissue type classification. *Metal Ions Biol Med*, 5, 572–577.
- Benninghoff, L., von Czarnowski, D., Denkhaus, E., & Lemke, K. (1997). Analysis of human tissues by total reflection X-ray fluorescence. Application of chemometrics for diagnostic cancer recognition. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 52(7), 1039–1046. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0584854796016266>
- Bernier, J., Cooper, J. S., Pajak, T. F., van Glabbeke, M., Bourhis, J., Forastiere, A., ... Lefèbvre, J. L. (2005). Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). *Head & neck*, 27(10), 843–50. doi:10.1002/hed.20279
- Beryllium and beryllium compounds. (2011). *IARC MONOGRAPHS*, 12, 67–70. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23572069>
- Boffetta, P. (1993). Carcinogenicity of trace elements with reference to evaluations made by the International Agency for Research on Carcinogenicity of trace elements with reference to evaluations made by the International Agency for Research on Cancer, (c), 67–70.
- Bolann, B. J., Rahil-Khazen, R., Henriksen, H., Isrenn, R., & Ulvik, R. J. (2007). Evaluation of methods for trace-element determination with emphasis on their usability in the clinical routine laboratory. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 67(4), 353–66. doi:10.1080/00365510601095281
- Boman, J., Magalhães, T., Carvalho, M. L., Von Bohlen, A., & Becker, M. (2010). Study on trace elements behaviour in cancerous and healthy tissues of colon, breast and stomach: Total reflection X-ray fluorescence applications. *Spectrochimica*

- Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0584854710001126>
- Bowen, H. J. M. (1976). *Trace elements in biochemistry* (2nd editio.). Academic Press.
- Bryne, M., Koppang, H. S., Lilleng, R., Stene, T., Bang, G., & Dabelsteen, E. (1989). New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 18(8), 432–7. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2607465>
- Cadmium and cadmium compounds. (2011). *IARC MONOGRAPHS*, 12, 80–3. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22544678>
- Carvalho, M. L., Magalhães, T., Becker, M., & Bohlen, A. Von. (2007). Trace elements in human cancerous and healthy tissues : A comparative study by EDXRF , TXRF, synchrotron radiation and PIXE, 62(November 2006), 1004–1011.
- Chaudhari, A., Hegde-shetiya, S., Shirahatti, R., & Agrawal, D. (2013). Comparison of Different Screening Methods in Estimating the Prevalence of Precancer and Cancer Amongst Male Inmates of a Jail in Maharashtra , India, 14, 859–864.
- Chromium and Chromium compounds. (1987). *IARC MONOGRAPHS*, 49.
- Cogliano, V. J., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., ... Wild, C. P. (2011). Preventable exposures associated with human cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(24), 1827–39. doi:10.1093/jnci/djr483
- Cohen, E. E. W., Baru, J., Huo, D., Haraf, D. J., Crowley, M., Witt, M. E., ... Stenson, K. (2009). Efficacy and safety of treating T4 oral cavity tumors with primary chemoradiotherapy. *Head & neck*, 31(8), 1013–21. doi:10.1002/hed.21062
- Divaris, K., Olshan, A. F., Smith, J., Bell, M. E., Weissler, M. C., Funkhouser, W. K., & Bradshaw, P. T. (2010). Oral health and risk for head and neck squamous cell carcinoma: the Carolina Head and Neck Cancer Study. *Cancer causes & control : CCC*, 21(4), 567–75. doi:10.1007/s10552-009-9486-9
- Elashoff, D., Zhou, H., Reiss, J., Wang, J., Xiao, H., Henson, B., ... Wong, D. T. W. (2012). Prevalidation of salivary biomarkers for oral cancer detection. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 21(4), 664–72. doi:10.1158/1055-9965.EPI-11-1093
- Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M., & Boyle, P. (2007). Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 18(3), 581–92. doi:10.1093/annonc/mdl498

- Ferreira Antunes, J. L., Toporcov, T. N., Biazzevic, M. G. H., Boing, A. F., Scully, C., & Petti, S. (2013). Joint and independent effects of alcohol drinking and tobacco smoking on oral cancer: a large case-control study. (O. Y. Gorlova, Ed) *PloS one*, 8(7), e68132. doi:10.1371/journal.pone.0068132
- Frieden, E. (1972). The chemical elements of life. *Scientific American*, 227(1), 52–60. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5044408>
- Fukuda, H., EBARA, M., YAMADA, H., ARIMOTO, M., OKABE, S., OBU, M., ... SAISHO, H. (2004). Trace Elements and Cancer. *JMAJ*, 129(5), 391–395.
- Galbiatti, A. L. S., Padovani-Junior, J. A., Maníglia, J. V., Rodrigues, C. D. S., Pavarino, É. C., & Goloni-Bertollo, E. M. (2013). Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 79(2), 239–247. doi:10.5935/1808-8694.20130041
- Genden, E. M., Ferlito, A., Silver, C. E., Takes, R. P., Suárez, C., Owen, R. P., ... Rinaldo, A. (2010). Contemporary management of cancer of the oral cavity. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 267(7), 1001–17. doi:10.1007/s00405-010-1206-2
- Gómez, I., Warnakulasuriya, S., Varela-Centelles, P. I., López-Jornet, P., Suárez-Cunqueiro, M., Diz-Dios, P., & Seoane, J. (2010). Is early diagnosis of oral cancer a feasible objective? Who is to blame for diagnostic delay? *Oral diseases*, 16(4), 333–42. doi:10.1111/j.1601-0825.2009.01642.x
- Goodwin, W. J., & Torres, J. (1984). The value of the prognostic nutritional index in the management of patients with advanced carcinoma of the head and neck. *Head & neck surgery*, 6(5), 932–7. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6427139>
- Gourin, C. G., & Podolsky, R. H. (2006). Racial disparities in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *The Laryngoscope*, 116(7), 1093–106. doi:10.1097/01.mlg.0000224939.61503.83
- Harris, D. C. (2010). *Quantitative Chemical Analysis* (p 750). W. H. Freeman.
- Hinerman, R. W., Mendenhall, W. M., Morris, C. G., Amdur, R. J., Werning, J. W., & Villaret, D. B. (2004). Postoperative irradiation for squamous cell carcinoma of the oral cavity: 35-year experience. *Head & neck*, 26(11), 984–94. doi:10.1002/hed.20091
- Hooper, S. J., Wilson, M. J., & Crean, S. J. (2009). Exploring the link between microorganisms and oral cancer: a systematic review of the literature. *Head & neck*, 31(9), 1228–39. doi:10.1002/hed.21140

- Horowitz, A. (2001). Perform a death-defying act: The 90-second oral cancer examination. *J Am Dent Assoc*, 132(suppl_1), 36S–40. Disponível em http://jada.ada.org/content/132/suppl_1/36S.full
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(2), 69–90. doi:10.3322/caac.20107
- Kerr, A. R., & Shah, S. S. (2013). Standard examination and adjunctive techniques for detection of oral premalignant and malignant lesions. *Journal of the California Dental Association*, 41(5), 329–31, 334–42. Disponível em <http://europepmc.org/abstract/MED/23795518>
- Khanna, S., Udas, A. C., Kumar, G. K., Suvarna, S., & Karjodkar, F. R. (2013). Trace elements (copper, zinc, selenium and molybdenum) as markers in oral sub mucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. doi:10.1016/j.jtemb.2013.04.003
- Lead and lead compounds. (2008). *IARC MONOGRAPHS*, 1989(2006), 2006–2010.
- Levi, F., Te, V.-C., Randimbison, L., Maspoli, M., & La Vecchia, C. (2006). Second primary oral and pharyngeal cancers in subjects diagnosed with oral and pharyngeal cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 119(11), 2702–4. doi:10.1002/ijc.22183
- Llewellyn, C. ., Johnson, N. ., & Warnakulasuriya, K. A. A. . (2001). Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people — a comprehensive literature review. *Oral Oncology*, 37(5), 401–418. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1368837500001354>
- Lodi, G., & Porter, S. (2008). Management of potentially malignant disorders: evidence and critique. Em *Journal of oral pathology medicine official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* (Vol 37, pp 63–69). Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18197849>
- Magalhães, T., von Bohlen, A., Carvalho, M. L., & Becker, M. (2006). Trace elements in human cancerous and healthy tissues from the same individual: A comparative study by TXRF and EDXRF. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 61(10-11), 1185–1193. doi:10.1016/j.sab.2006.06.002
- Mamelle, G., Pampurik, J., Luboinski, B., Lancar, R., Lusinchi, A., & Bosq, J. (1994). Lymph node prognostic factors in head and neck squamous cell carcinomas. *The American Journal of Surgery*, 168(5), 494–498. doi:10.1016/S0002-9610(05)80109-6
- Massano, J., Regateiro, F. S., Januário, G., & Ferreira, A. (2006). Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, 102(1), 67–76. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.038

- Mehrotra, R., & Gupta, D. K. (2011). Exciting new advances in oral cancer diagnosis: avenues to early detection. *Head neck oncology*, 3(1), 33. Disponível em <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3170277&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Messadi, D. V. (2013). Diagnostic aids for detection of oral precancerous conditions. *International journal of oral science*, 5(2), 59–65. doi:10.1038/ijos.2013.24
- Monteiro, L. S., Antunes, L., Bento, M. J., & Warnakulasuriya, S. (2013). Incidence rates and trends of lip, oral and oro-pharyngeal cancers in Portugal. *J Oral Pathol Med*, 42(4), 345–351. doi:10.1111/jop.12010
- Moore, C., Flynn, M. B., & Greenberg, R. A. (1986). Evaluation of size in prognosis of oral cancer. *Cancer*, 58(1), 158–62. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3708540>
- Mulware, S. J. (2012). Trace elements and carcinogenicity: a subject in review. 3 *Biotech*, 3(2), 85–96. doi:10.1007/s13205-012-0072-6
- Mulware, S. J. (2013). Comparative Trace Elemental Analysis in Cancerous and Noncancerous Human Tissues Using PIXE. *Journal of Biophysics*, 2013, 8. Disponível em <http://www.hindawi.com/journals/jbp/2013/192026/abs/>
- Nair, D. R., Pruthy, R., Pawar, U., & Chaturvedi, P. (2012). Oral cancer: Premalignant conditions and screening--an update. *Journal of cancer research and therapeutics*, 8 Suppl 1, S57–66. doi:10.4103/0973-1482.92217
- Nasulewicz, A., Mazur, A., & Opolski, A. (2004). Role of copper in tumour angiogenesis—clinical implications. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18(1), 1–8. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0946672X04000082>
- Navarro Silvera, S. A., & Rohan, T. E. (2007). Trace elements and cancer risk: a review of the epidemiologic evidence. *Cancer causes & control : CCC*, 18(1), 7–27. doi:10.1007/s10552-006-0057-z
- Nayak, A. G., Laxmikanth, C., & Prashanth, S. (2010). Analysis of Copper and Zinc Levels in the Mucosal Tissue and Serum of Oral Submucous Fibrosis Patients. *World Journal of Dentistry*, 1(2), 75–78. Disponível em -----
- Neville, B. W., & Day, T. a. (2002). Oral cancer and precancerous lesions. *CA: a cancer journal for clinicians*, 52(4), 195–215. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23273345>
- Nyst, H. J., Tan, I. B., Stewart, F. A., & Balm, A. J. M. (2009). Is photodynamic therapy a good alternative to surgery and radiotherapy in the treatment of head and neck cancer? *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 6(1), 3–11. doi:10.1016/j.pdpdt.2009.03.002

- Patel, S. G., & Shah, J. P. (2005). TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. *CA: a cancer journal for clinicians*, 55(4), 242–58; quiz 261–2, 264. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020425>
- Patton, L. L., Epstein, J. B., & Kerr, A. R. (2008). Adjunctive techniques for oral cancer examination and lesion diagnosis: a systematic review of the literature. *Journal of the American Dental Association* (1939), 139(7), 896–905; quiz 993–4. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18594075>
- Patton, L. L., Epstein, J. B., Ross, A., Rcsed, F. D. S., Frcd, C., & Kerr, A. R. (2008). Systematic Review of the Literature ABSTRACT.
- Peacock, Z. S., Pogrel, M. A., & Schmidt, B. L. (2008). Exploring the reasons for delay in treatment of oral cancer. *Journal of the American Dental Association* (1939), 139(10), 1346–52. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18832270>
- Ram, H., Sarkar, J., Kumar, H., Konwar, R., Bhatt, M. L. B., & Mohammad, S. (2011). Oral cancer: risk factors and molecular pathogenesis. *Journal of maxillofacial and oral surgery*, 10(2), 132–7. doi:10.1007/s12663-011-0195-z
- Reddy, S. B., John Charles, M., Naga Raju, G. J., Vijayan, V., Seetharami Reddy, B., Ravi Kumar, M., & Sundareswar, B. (2003). Trace elemental analysis of carcinoma kidney and stomach by PIXE method. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 207(3), 345–355. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168583X03004634>
- Riaz, A., Shreedhar, B., Kamboj, M., & Natarajan, S. (2013). Methylene blue as an early diagnostic marker for oral precancer and cancer. *SpringerPlus*, 2(1), 95. doi:10.1186/2193-1801-2-95
- Ribeiro, K. de C. B. (2000). Impact of Comorbidity, Symptoms, and Patients' Characteristics on the Prognosis of Oral Carcinomas. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 126(9), 1079. doi:10.1001/archotol.126.9.1079
- Rouessac, F., & Rouessac, A. (2013). *Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques* (2nd ed, p 600). John Wiley & Sons.
- Sankaranarayanan, R., Ramadas, K., Thomas, G., Muwonge, R., Thara, S., Mathew, B., & Rajan, B. (2005). Effect of screening on oral cancer mortality in Kerala, India: A cluster-randomized controlled trial. *Lancet*, 365(9475), 1927–1933.
- Sarita, P., Naga Raju, G. J., Pradeep, A. S., Rautray, T. R., Seetharami Reddy, B., Bhuloka Reddy, S., & Vijayan, V. (2011). Analysis of trace elements in blood sera of breast cancer patients by particle induced X-ray emission. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 294(3), 355–361. doi:10.1007/s10967-011-1505-0


- Schliephake, H. (2003). Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer--a review. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 32(3), 233–245. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12767868>
- Secretan, B., Straif, K., Baan, R., Grosse, Y., Ghissassi, F. El, Bouvard, V., ... Group, W. (2009). Special Report : Policy A review of human carcinogens — Part E : tobacco , areca nut , alcohol , coal smoke , and salted fi sh. *Lancet Oncology*, 10(11), 1033–1034. doi:10.1016/S1470-2045(09)70326-2
- Settle, F. A. (1997). *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry, Volume 1*. (F. A. Settle, Ed) (p 995). Prentice Hall PTR.
- Shackley, M. S. (2011). *An Introduction to X-Ray Fluorescence (XRF) Analysis in Archaeology*. doi:10.1007/978-1-4419-6886-9
- Shah, J. P., & Gil, Z. (2009). Current concepts in management of oral cancer – Surgery. *Oral Oncology*, 45(4-5), 394–401. doi:10.1016/j.oraloncology.2008.05.017
- Shetty, S. R., Babu, S., Kumari, S., Shetty, P., Hegde, S., & Karikal, A. (2013). Role of Serum Trace Elements in Oral Precancer and Oral Cancer - a Biochemical Study. *Journal of Cancer Research and Treatment*, 2013 1 (1), pp 1-3, 1(1), 1–3. doi:10.12691/jcrt-1-1-1
- Shintani, S., Li, C., Ishikawa, T., Mihara, M., Nakashiro, K., & Hamakawa, H. (2004). Expression of vascular endothelial growth factor A, B, C, and D in oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology*, 40(1), 13–20. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14662410>
- Shpitzer, T., Bahar, G., Feinmesser, R., & Nagler, R. M. (2007). A comprehensive salivary analysis for oral cancer diagnosis. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 133(9), 613–7. doi:10.1007/s00432-007-0207-z
- Silva, Mariana, Tomal, A., Pérez, C. A., Ribeiro-Silva, A., & Poletti, M. E. (2009). Determination of Ca, Fe, Cu and Zn and their correlations in breast cancer and normal adjacent tissues. *X-Ray Spectrometry*, 38(2), 103–111. doi:10.1002/xrs.1126
- Silva, Marina, Soave, D. F., Ribeiro-Silva, A., & Poletti, M. E. (2012). Trace elements as tumor biomarkers and prognostic factors in breast cancer: a study through energy dispersive x-ray fluorescence. *BMC research notes*, 5, 194. doi:10.1186/1756-0500-5-194
- Smith, B., & Haffty, B. (2009). Chapter 2 - Prognostic factors in patients with head and neck cancer. Em L. B. Harrison, R. B. Sessions, & K. H. Waun (Eds), *Head and Neck Cancer: A Multidisciplinary Approach* (Third edit., p 960). Lippincott Williams & Wilkins.
- Speight, P., Warnakulasuriya, S., & Ogden, G. (2010). *Early detection and prevention of oral cancer: a management strategy for dental practice*. (P. Speight, S. Warnakulasuriya, & G. Ogden, Eds). The British Dental Association.

- Spiro, R. H., Alfonso, A. E., Farr, H. W., & Strong, E. W. (1974). Cervical node metastasis from epidermoid carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *The American Journal of Surgery*, 128(4), 562–567. doi:10.1016/0002-9610(74)90276-1
- Takes, R. P., Baatenburg De Jong, R. J., Alles, M. J. R. C., Meeuwis, C. A., Marres, H. A. M., Knecht, P. P. M., ... Van Krieken, J. H. J. M. (2002). Markers for nodal metastasis in head and neck squamous cell cancer. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*, 128(5), 512–8. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12003581>
- Trace elements in human nutrition and health*. (1996). Geneva. Disponível em http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_532.pdf
- Vanadium Pentoxide. (1975). *IARC MONOGRAPHS*, 36(9), 711–712. doi:10.1080/0002889758507321
- Warnakulasuriya, S. (2009). Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*, 45(4-5), 309–316. doi:10.1016/j.oraloncology.2008.06.002
- Warnakulasuriya, S., Trivedy, C., & Peters, T. J. (2002). Areca nut use: an independent risk factor for oral cancer. *British Medical Journal*, 324(April), 799–800.
- Woolgar, J. A. (2006). Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral oncology*, 42(3), 229–39. doi:10.1016/j.oraloncology.2005.05.008
- Zini, A., Czerninski, R., & Sgan-Cohen, H. D. (2010). Oral cancer over four decades: epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 39(4), 299–305. doi:10.1111/j.1600-0714.2009.00845.x

ANEXOS


Anexo 1:

Póster apresentado nas XXI Jornadas Internacionais de Medicina Dentária no ISCSEM



Técnica de WDXRF para quantificação elementar em tecidos neoplásicos orais

Marques, AG; Silva Marques, JM; Brito, JA; Zagalo, C



OBJECTIVO

Este Poster visa justificar a necessidade de realizar um trabalho de investigação que comprove a presença de elementos vestigiais em maiores concentrações em tecidos carcinomatosos da cavidade oral, e assim poder usá-los como biomarcadores de diagnóstico.

INTRODUÇÃO

Para a determinação das concentrações desses elementos utilizar-se-á uma técnica de fluorescência de raios-X por dispersão em comprimento de onda (WDXRF – Wavelength Dispersive X-ray Fluorescence), que permite quantificar a concentração atômica do conteúdo da amostra sem a danificar. Vários estudos comprovam uma maior concentração de elementos vestigiais em tecidos neoplásicos (benignos ou malignos) do que em tecidos saudáveis. No entanto, em tecidos carcinomatosos da cavidade oral, ainda não há nenhum estudo que comprove este aumento de concentração.

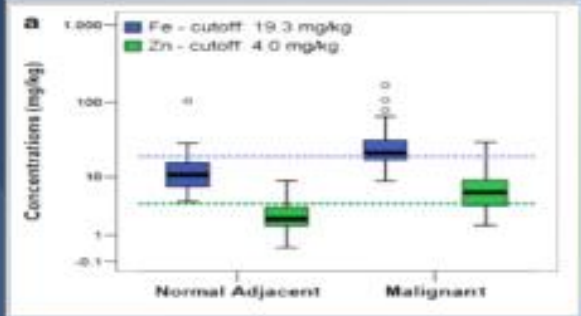




Fig 1 e 2 – máquina de WDXRF do ISCSEM e esquema do seu funcionamento

Fig 3 – gráfico das concentrações dos elementos vestigiais Fe e Zn em tecidos da mama saudável e neoplásicos.

ELEMENTOS VESTIGIAIS

Zn

O Zinco é um metal essencial para o organismo humano, desempenhando um papel fundamental em diversos processos biológicos. A sua deficiência pode levar a problemas de saúde, incluindo anemia, osteoporose e problemas de crescimento. O Zinco é encontrado em alimentos como carne, peixe, ovos, leite e grãos.

Cu

O Cobre é um metal essencial para o organismo humano, desempenhando um papel fundamental em diversos processos biológicos. A sua deficiência pode levar a problemas de saúde, incluindo anemia, osteoporose e problemas de crescimento. O Cobre é encontrado em alimentos como carne, peixe, ovos, leite e grãos.

Fe

O Ferro é um metal essencial para o organismo humano, desempenhando um papel fundamental em diversos processos biológicos. A sua deficiência pode levar a problemas de saúde, incluindo anemia, osteoporose e problemas de crescimento. O Ferro é encontrado em alimentos como carne, peixe, ovos, leite e grãos.

RESULTADOS

1. Existe uma relação direta entre um tecido carcinomatoso e o aumento das concentrações dos elementos vestigiais
2. Até à data não existem estudos que comprovem, através da técnica de fluorescência de raios-X, o aumento das concentrações dos elementos vestigiais no cancro oral
3. A técnica de fluorescência de raios-X surge como um excelente método de análise elementar (qualitativa e quantitativa) de amostras biológicas.

CONCLUSÃO

Uma vez que o ISCSEM possui uma máquina de WDXRF, será possível aproveitando a colaboração do Instituto Português de Oncologia (IPO), avançar na determinação da presença de elementos vestigiais em maiores concentrações em amostras de tecido neoplásico da cavidade oral em comparação com amostras de tecido saudável.

BIBLIOGRAFIA

1. The role of trace elements in secondary colorectal liver cancer and their use as a tissue classifier Farquharson, Michael et al, Journal of X-Ray Spectrometry
2. Estudo da distribuição de elementos vestigiais em tecidos humanos saudáveis e com carcinoma por espectrometria de raios-X, Tânia Almeida
3. Trace Elements and Cancer, Hironori KURODA et al, JMAJ 47(8): 381-385, 2004
4. Trace elements as tumor biomarkers and prognostic factors in breast cancer: a study through energy dispersive x-ray fluorescence, Madina P Silva et al, BMC Research Notes 2015, 8:294
5. Essential Trace Elements and Cancer, B.G.R. Brahmam et al, Orthomolecular Psychiatry, Volume 11, nr 1, 1982, Pp.28-41

